

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FLAVANOLES
DEL CACAO EN RIÑÓN Y ENDOTELIO DURANTE
LA DIABETES. ESTUDIO EN CULTIVOS
CELULARES Y ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

David Álvarez Cilleros

DIRECTOR

María Ángeles Martín Arribas
Sonia Ramos Rivero



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FLAVANOLES
DEL CACAO EN RIÑÓN Y ENDOTELIO DURANTE
LA DIABETES. ESTUDIO EN CULTIVOS
CELULARES Y ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN

TESIS DOCTORAL

Autor

David Álvarez Cilleros

Directoras

Dra. María Ángeles Martín Arribas

Dra. Sonia Ramos Rivero

Facultad de Farmacia

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FLAVANOLES
DEL CACAO EN RIÑÓN Y ENDOTELIO DURANTE
LA DIABETES. ESTUDIO EN CULTIVOS
CELULARES Y ANIMALES DE
EXPERIMENTACIÓN**

TESIS DOCTORAL

Trabajo de investigación presentado por David Álvarez Cilleros para optar al grado de Doctor
por la Universidad Complutense de Madrid (UCM),

Vº Bueno de los directores:

Vº Bueno del tutor:

Vº Bueno del doctorando:

Dra. M^a Ángeles Martín Arribas

Dra. Carmen Álvarez Escolá

David Álvarez Cilleros

Dra. Sonia Ramos Rivero

Facultad de Farmacia
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



Las **Dras. M^a Ángeles Martín Arribas y Sonia Ramos Rivero**, Científicos Titulares del Departamento de Metabolismo y Nutrición del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) certifican que el trabajo de investigación titulado:

“Mecanismos de acción de los flavanoles del cacao en riñón y endotelio durante la diabetes. Estudio en cultivos celulares y animales de experimentación”.

Presentado por **David Álvarez Cilleros** para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Metabolismo y Nutrición del ICTAN perteneciente al CSIC.

Fdo.:

Dra. M^a Ángeles Martín Arribas

Fdo.:

Dra. Sonia Ramos Rivero

SEDE CIUDAD UNIVERSITARIA:

C/ JOSÉ ANTONIO NOVÁIS, 10
CIUDAD UNIVERSITARIA
28040 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 544 56 07 – 91 549 23 00
FAX: 91 549 36 27

SEDE JUAN DE LA CIERVA:

C/JUAN DE LA CIERVA, 3
28006 MADRID, ESPAÑA
TELS.: 91 562 29 00
FAX: 91 564 48 53



ALCANCE: La gestión y ejecución de proyectos y contratos de investigación en el área de ciencia y tecnología de alimentos y nutrición.

El presente trabajo ha sido financiado por el proyecto (AGL2015-67087-R) del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO).

David Álvarez Cilleros ha dispuesto de una Ayuda para contratos predoctorales para la formación de doctores (BES-2016-076721) durante el periodo 2017-2020.

Agradecimientos

Agradecimientos

Hace más de 3 años que entré en el ICTAN, pero si ahora estoy escribiendo estas líneas es porque hace 6 años que decidí meterme en el mundo de la investigación, por lo que me siento en deuda con todas y cada una de las personas que me han aportado algo durante todo este recorrido.

En primer lugar quiero dar las gracias a **José María Carrascosa**, fue la primera persona que confió en mí y con quien empecé en la investigación, gracias por darme esa gran oportunidad, sin duda ha sido el comienzo de todo lo que ha venido después.

También quiero dar las gracias a la gente del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Farmacia, sin duda, ellos tienen gran culpa de que haya llegado hasta aquí, los casi 2 años que pasé allí me formaron como investigador, pero sobre todo como persona, me demostraron que siendo buena persona se puede llegar a ser bueno en la investigación, porque tal y como decía el Dr. Carrascosa: *“me alegro de que hayas escogido ese grupo porque son muy buenos, hacen muy buena Ciencia, y son lo más honesto que hay, para mí fue siempre un placer trabajar con ellos”*. No me olvido de nadie, ni de los que estuvieron compartiendo laboratorio conmigo, ni de los que han llegado después:

Gracias **Sabela** por darnos un ejemplo a todos los que estábamos a tu alrededor de que con constancia y sacrificio todo se puede conseguir.

Gracias **Vanesa** por tus consejos laborales, pero también personales, de nuestras largas conversaciones de sobremesa me llevo muchas cosas.

Gracias **Elena** y **Lea** por vuestra compañía, fueron pocos meses juntos, pero sin duda, vuestra presencia lo hizo todo más fácil.

Gracias **Támara** y **Alicia** por las conversaciones cada vez que aparezco por allí.

Gracias **Paula** por tus conocimientos sobre microbiota y sobre nutrición, pero sobre todo, por el congreso de Barcelona.

Gracias **Fernando** por tus consejos docentes y por tus chistes de barrio que a mí me alegraban las mañanas, compartimos despacho pocos meses, pero sin duda fueron momentos que nunca olvidaré.

Gracias **Elisa** por enseñarme a pensar, a escribir y a investigar, sin tu paciencia y confianza nada de esto hubiera sido posible.

Gracias **Carmen** por tus conversaciones y consejos, pero sobre todo por tu honestidad, siempre fuiste muy sincera conmigo, incluso cuando serlo te perjudicaba.

Agradecimientos

Quiero dar las gracias a **Elvira López Oliva**, por su gran trabajo con los cortes histológicos y las numerosas horas sentada en el microscopio, pero también por los 3 meses que compartimos horas de laboratorio y conversaciones.

Además, quiero dar las gracias a toda la gente del ICTAN, empezando por la gente que trabaja en el mantenimiento, seguridad y limpieza del Instituto, siempre me trataron con cariño y me ayudaron en la medida de lo posible. También quiero dar las gracias a los investigadores del centro, en especial a **María Blanch**, por su alegría y amabilidad, aunque nunca trabajamos juntos, hubiera sido un placer hacerlo.

Gracias **Luis** por enseñarme algunas técnicas de laboratorio.

Gracias **Sonia** por tu esfuerzo y sacrificio, no has parado de trabajar y de ayudarme en los experimentos y en la escritura de esta tesis desde que entré aquí.

Gracias **Nines** por hacerme participe del campo de la divulgación, han sido momentos muy agradables tanto dentro como fuera del centro, y gracias por tu ambición de búsqueda de nuevos ensayos y resultados, y tu esfuerzo en la recta final de la tesis.

También quiero dar las gracias a las personas que han pasado por este laboratorio durante estos más de 3 años y que ya no están, haya sido mucho o poco tiempo, cada uno de ellos ha hecho más fácil todos estos días aquí: **Tatiane, Gossia, Françoise**, y en especial a 3 personas, **Cristina, Agustín y Eleni**, fueron 3 meses muy buenos a vuestro lado de los que me llevo una gran amistad. Gracias también a los últimos en llegar, aparecieron tarde, pero en el mejor momento:

Gracias **Susana, Joaquín, Rosa, Miguel y Mónica** por alegrarme esta última etapa con vuestros cotilleos, con vuestras bromas y con infinitas cervezas y días de *afterwork*, sin duda llegasteis en el momento más oportuno para crear buen ambiente, pero también para crear una bonita amistad.

Gracias **Sergio** por tu cariño y tu simpatía, fuiste el último fichaje del laboratorio, y aunque compartimos poco tiempo en el laboratorio, eres una increíble persona que siempre va a estar ahí.

Quiero agradecer a la gente de fuera del entorno de trabajo, sin duda, ellos son partícipes de todo esto, con sus palabras de apoyo y su cariño en todo momento, en especial a **mi familia y mi primo**, que siempre han estado ahí cuando más se les necesitaba. Tampoco me quiero olvidar de mis amigos, esos que conocí en la carrera y que tantas alegrías me han dado, gracias **Pablo, Juan y Mario** por tantos años de amistad verdadera y de cariño incondicional.

Agradecimientos

Y las últimas líneas son para **ti**, porque apareciste en el momento exacto, y desde entonces no has dejado de regalarme buenos momentos y de hacerme feliz, sobre todo en estos últimos meses, sin tu apoyo, nada de esto hubiera sido posible. Si hay una cosa que está clara es que las casualidades existen, GRACIAS.

Abreviaturas	1
Resumen	9
Abstract.....	15
Introducción	19
1. Compuestos fenólicos.....	21
1.1. Estructura y clasificación.	21
1.1.1. Flavonoides.	22
1.1.2. No flavonoides.....	24
1.2. Ingesta, biodisponibilidad y metabolismo.....	26
1.3. Actividad biológica.	29
1.3.1. Actividad antioxidante.....	29
1.3.2. Actividad antidiabética.	30
1.3.3. Actividad antiobesogénica.....	30
1.3.4. Actividad antiinflamatoria.....	30
1.3.5. Actividad cardioprotectora.	31
1.3.6. Actividad anticancerígena.....	31
1.3.7. Actividad moduladora de la microbiota intestinal.....	32
1.3.8. Otras actividades.....	32
2. Estrés oxidativo, inflamación y enfermedad.....	32
2.1. Especies reactivas de oxígeno.	33
2.2. Defensas antioxidantes.....	35
2.2.1. Defensas antioxidantes no enzimáticas.....	35
2.2.2. Defensas antioxidantes enzimáticas.....	35
2.3. Proceso inflamatorio.	36
2.4. Mecanismos antiinflamatorios.....	37
2.5. Vías de señalización celular.	38
2.5.1. Ruta de las MAPKs.....	38
2.5.2. Ruta de la proteína quinasa B.	40
2.5.3. Ruta de la sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD.	41
2.5.4. Regulación de los factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo.....	42
3. Diabetes.....	44
3.1. Generalidades y clasificación.	44
3.1.1. Diabetes tipo 1.....	44
3.1.2. Diabetes tipo 2.....	45

Índice

3.1.3. Diabetes mellitus gestacional.	45
3.1.4. Diabetes de la edad madura que aparece en el joven.	45
3.2. Metabolismo de los carbohidratos.	45
3.3. Fisiopatología.	47
3.4. Complicaciones diabéticas renales.....	48
3.4.1. Fisiología renal.	48
3.4.2. Fisiopatología.	49
3.5. Complicaciones diabéticas cardiovasculares.....	51
3.5.1. Fisiología arterial.	51
3.5.2. Fisiopatología.	52
3.6. Diabetes y polifenoles.....	53
4. Microbiota intestinal.	53
4.1. Composición y funciones.	54
4.1.1. Modulación de la repuesta inmune.	54
4.1.2. Regulación de la permeabilidad intestinal.	55
4.1.3. Metabolización de los nutrientes.	56
4.2. Ácidos grasos de cadena corta.....	56
4.2.1. Estructura y función.	56
4.2.2. Receptores de ácidos grasos libres.....	57
4.3. Disbiosis.	58
4.3.1. Patologías metabólicas.....	58
4.3.2. Disbiosis y polifenoles.	59
5. Cacao.....	59
5.1. Composición.	60
5.2. Actividad biológica.	60
5.2.1. Actividad antioxidante.....	60
5.2.2. Actividad antidiabética.	60
5.2.3. Actividad antiobesogénica.....	61
5.2.4. Actividad antiinflamatoria.....	61
5.2.5. Actividad cardioprotectora.	61
5.2.6. Actividad anticancerígena.....	62
5.2.7. Actividad moduladora de la microbiota intestinal.....	62
5.2.8. Otras actividades.....	62
Objetivos.....	63
Material y métodos.....	67

1. Reactivos.	69
2. Modelos experimentales.	70
2.1. Cultivos celulares.....	70
2.1.1. Células NRK-52E.....	70
2.1.2. Células EA.hy926.	71
2.1.3. Células THP-1.	71
2.2. Animales de experimentación.....	72
2.2.1. Rata Zucker Diabética Obesa.....	72
2.2.2. Dieta rica en cacao.	72
3. Preparación de muestras.	73
3.1. Preparación de extractos proteicos celulares.	73
3.2. Muestras tisulares.....	73
3.2.1. Bioquímica de tejidos y suero.....	73
3.2.2. Histología de los tejidos.....	74
3.3. Muestras fecales.....	74
4. Técnicas.....	74
4.1. Técnicas bioquímicas.	74
4.1.1. Viabilidad por cristal violeta.	74
4.1.2. Producción de las especies reactivas de oxígeno.	74
4.1.3. Contenido del glutatión reducido.	75
4.1.4. Actividad de enzimas antioxidantes.....	75
4.1.5. Contenido de grupos carbonilos.	75
4.1.6. Producción del óxido nítrico.....	75
4.1.7. Ensayo de producción de glucosa.....	76
4.1.8. Ensayo de captación de glucosa.	76
4.1.9. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.....	77
4.1.10. Inmunoprecipitación.....	77
4.1.11. Western blot.	77
4.1.12. Test de Tolerancia a la Glucosa.	78
4.1.13. Determinación de parámetros bioquímicos con Kits comerciales.	78
4.2. Técnicas microscópicas.....	79
4.2.1. Marcaje fluorescente.	79
4.2.2. Tinción histológica.	79
4.2.3. Marcaje inmunohistoquímico.	80

Índice

4.2.4. Ensayo de marcaje del dUTP terminal por la transferasa.....	81
4.3. Técnicas vasculares.	81
4.3.1. Monitorización hemodinámica.	81
4.3.2. Reactividad vascular.....	82
4.4. Técnicas genéticas.	82
4.5. Técnicas cromatográficas.	83
4.5.1. Cromatografía de gases.	83
4.5.2. Cromatografía de intercambio iónico.....	83
5. Análisis estadístico.....	84
Resultados	85
1. Capítulo primero - Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo renal en modelos de experimentación.	87
1.1. Resumen de los estudios en células renales en cultivo.....	87
1.1.1. Artículo I.	87
1.1.2. Artículo II.	100
1.1.3. Artículo III.	112
1.2. Resumen de los estudios renales en animales de experimentación.	124
1.2.1. Artículo IV.	124
1.2.2. Artículo V.	135
2. Capítulo segundo - Efecto de los flavanoles del cacao sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo vascular en modelos de experimentación.....	151
2.1. Resumen de los estudios en células endoteliales en cultivo.	151
2.1.1. Artículo VI.	151
2.2. Resumen de los estudios en aorta de animales de experimentación.	163
2.2.1. Artículo VII.	163
3. Capítulo tercero - Efecto de los flavanoles del cacao sobre la salud intestinal y la microbiota intestinal en animales diabéticos.	181
3.1. Resumen de los estudios en animales de experimentación.	181
3.1.1. Artículo VIII.	181
4. Capítulo cuarto - Efecto antiinflamatorio de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos en modelos de experimentación.	198
4.1. Resultados inéditos investigación renal.	198
4.1.1. Estudios en células renales en cultivo.	198
4.1.2. Estudios renales en animales de experimentación.....	201

4.2. Resultados inéditos investigación endotelial.....	211
4.2.1. Estudios en células endoteliales en cultivo.....	211
4.2.2. Estudios en aorta de animales de experimentación.	213
Discusión integradora	221
1. Capítulo primero - Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo renal en modelos de experimentación.	223
1.1. Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre la homeostasis glucídica de las células tubulares proximales NRK-52E.	223
1.2. Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre el estrés oxidativo en las células NRK-52E.	228
1.3. Efecto de una dieta rica en cacao sobre la modulación de la homeostasis glucídica en ratas diabéticas ZDF.....	231
1.4. Efecto de una dieta rica en cacao sobre el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia en ratas diabéticas ZDF.	235
2. Capítulo segundo - Efecto de los flavanoles del cacao sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo vascular en modelos de experimentación.....	239
2.1. Efecto de los ácidos fenólicos derivados de la ingesta de cacao sobre la disfunción endotelial inducida por el estrés oxidativo en las células EA.hy926.	239
2.2. Efecto de una dieta rica en cacao sobre la rigidez, el remodelado aórtico y el estrés oxidativo en ratas diabéticas ZDF.....	242
3. Capítulo tercero - Efecto de los flavanoles del cacao sobre la salud intestinal y la microbiota intestinal en ratas diabéticas ZDF.....	246
4. Capítulo cuarto - Efecto antiinflamatorio de los flavanoles del cacao en modelos de experimentación.	250
4.1. Efecto del cacao, la EC y los metabolitos colónicos sobre la inflamación en células renales y en el riñón de ratas diabéticas ZDF.	250
4.2. Efecto del cacao y una mezcla de sus metabolitos colónicos sobre la inflamación en células endoteliales y en la arteria de ratas diabéticas ZDF.	253
Conclusiones.....	257
Bibliografía	261

·OH: radical hidroxilo.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AGEs: productos finales de glicosilación avanzada.

AI: índice de aumento.

AMPK: proteína quinasa activada por adenosina monofosfato.

AREs: elementos de respuesta.

ATP: adenosín trifosfato.

Bax: proteína 4 similar a la proteína 2 de célula beta de linfoma.

Bcl-x_L: proteína de célula beta de linfoma extragrande.

Casp-3: caspasa 3.

Casp-9: caspasa 9.

CAT: catalasa.

CBG: beta-glucosidasa citosólica.

CKD: enfermedad crónica renal.

COX-2: ciclooxigenasa 2.

CVD: enfermedad cardiovascular.

DHBA: ácido-2,3-dihidroxibenzoico.

DHPAA: ácido-3,4-dihidroxifenilacético.

DN: nefropatía diabética.

dSAP: presión arterial sistémica diastólica.

EC: epicatequina.

EGCG: epigallocatequina-3-galato.

eGFR: ratio estimado de filtración glomerular.

ELISA: ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima.

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial.

ERKs: quinasas reguladas por señales extracelulares.

FFAR2: receptor de los ácidos grasos libres 2.

Abreviaturas

FFAR3: receptor de los ácidos grasos libres 3.

FOXO: factor de transcripción para las zonas con cabeza de horquilla.

G-6-Pasa: glucosa 6 fosfatasa.

GBM: membrana basal glomerular.

GDM: diabetes mellitus gestacional.

GLUT: transportador de glucosa.

GLUT1: transportador de glucosa 1.

GPx: glutathion peroxidasa.

GR: glutathion reductasa.

GS: glucógeno sintasa.

GSH: glutathion reducido.

GSK3: glucógeno sintasa quinasa.

GSSG: glutathion oxidado.

GTT: test de tolerancia a la glucosa.

H&E: hematoxilina y eosina.

H₂O₂: peróxido de hidrogeno.

HbA1c: hemoglobina glicosilada.

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal.

HOMA-B: modelo homeostático de evaluación de la funcionalidad beta.

HOMA-IR: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina.

HOMA-IS: modelo homeostático de evaluación de la sensibilidad a la insulina.

HPLC: cromatografía líquida de alta presión.

HPPA: ácido-3,4-hidroxifenilpropiónico.

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1.

IKK: quinasas de las proteínas inhibidoras del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

IL-10: interleuquina 10.

IL-12: interleuquina 12.

IL-1 β : interleuquina 1 beta.

IL-4: interleuquina 4.

IL-6: interleuquina 6.

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible.

IR: receptor de insulina.

IRS-1: sustrato del receptor de insulina.

I κ B: proteínas inhibidoras del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B.

JNKs: quinasas N-terminal de c-Jun.

Keap-1: proteína Kelch asociada a la proteína eritroide 1.

LDL: lipoproteína de baja densidad.

LI: índice de marcaje nucleares.

LPH: lactasa-florizina hidrolasa.

LPS: lipopolisacárido.

M1: macrófagos clásicos.

M2: macrófagos alternativos.

MAPKK: quinasas activadoras de proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MAPKKK: quinasas activadoras de quinasas activadoras de proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MAPKs: proteínas quinasas activadas por mitógenos.

MCP-1: proteína de quimioatracción de monocitos 1.

MDA: malondialdehído.

MODY: diabetes de la edad madura que aparece en el joven.

mSAP: presión arterial sistémica media.

NAD⁺: nicotín adenín dinucleótido.

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Abreviaturas

NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal.

NO: óxido nítrico.

NOS: óxido nítrico sintasa.

NOX: nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa.

Nrf2: factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide-2.

O₂⁻: anión superóxido.

OTUs: unidades taxonómicas operativas.

p38: quinasa p38.

PAS: ácido periódico de Schiff.

PCA: análisis de componentes principales.

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa.

PI3K: fosfatidilinositol-3-quinasa.

PIP: fosfatidilinositol-3-fosfato.

PIP2: fosfatidilinositol-3,4-bifosfato.

PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato.

PKB/AKT: proteína quinasa B.

PKC: proteína quinasa C.

PP: pulso de presión.

PTEN: fosfatasa homóloga de la tensina.

PUFAs: ácidos grasos poli-insaturados.

RAGEs: receptores de productos finales de glicosilación avanzada.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

SCFAs: ácidos grasos de cadena corta.

SGLT: cotransportador de sodio-glucosa.

SGLT-2: cotransportador de sodio-glucosa 2.

SIRT-1: sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD.

SOD: superóxido dismutasa.

sSAP: presión arterial sistémica sistólica.

t-BOOH: tert-butil hidroperóxido.

T1D: diabetes tipo 1.

T2D: diabetes tipo 2.

TGF-β: factor de crecimiento transformante beta.

TH2: linfocitos colaboradores de tipo 2.

TLR4: receptor tipo toll 4.

TNF-α: factor de necrosis tumoral alfa.

TUNEL: marcaje del dUTP terminal por la transferasa.

VA: ácido-4-hidroxi-3-metoxibenzoico.

VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1.

WB: Western blot.

ZDF: Zucker obesa diabética.

ZO-1: zónula occludens 1.

Introducción:

La *diabetes tipo 2* (T2D, de sus siglas en inglés Type 2 Diabetes) es considerada una de las patologías con mayor incidencia en el mundo, y se caracteriza por un cuadro clínico de resistencia a la insulina y un defecto en la secreción de la misma que conduce a niveles altos de glucosa en sangre, y a una glucotoxicidad tisular. Esta hiperglucemia altera numerosas vías de transducción de señales y favorece el desequilibrio del estado redox, conduciendo a la aparición de las complicaciones diabéticas que afectan a varios tejidos, destacando las complicaciones macrovasculares (alteraciones del endotelio vascular) y las complicaciones microvasculares (nefropatía, entre otras). En este sentido, los polifenoles de la dieta (como los presentes en el cacao), y los ácidos fenólicos derivados de su metabolismo microbiano podrían prevenir estas alteraciones debido a sus propiedades antioxidantes, antidiabéticas y antiinflamatorias. Estas actividades biológicas de los polifenoles vienen dadas por los compuestos puros, como la *epicatequina* (EC) y por los metabolitos colónicos resultantes de su metabolismo por la microbiota intestinal, como el *ácido-2,3-dihidroxibenzoico* (DHBA, de sus siglas en inglés 2,3-dihydroxybenzoic acid), el *ácido-3,4-dihidroxifenilacético* (DHPAA, de sus siglas en inglés 3,4-dihydroxyphenylacetic acid) y el *ácido-3,4-hidroxifenilpropiónico* (HPPA, de sus siglas en inglés 3,4-hydroxyphenylpropionic acid), que son los más abundantes en orina y plasma tras la ingesta de alimentos ricos en flavanoles. Este hecho convierte al microbioma en un componente clave para el desarrollo de las distintas propiedades de los compuestos fenólicos. La microbiota intestinal participa en múltiples funciones en el organismo, entre las que destacan su capacidad de modular el sistema inmune y de regular la permeabilidad intestinal y el metabolismo de los nutrientes. Así, pequeños cambios en la composición de la microbiota intestinal podrían dar lugar a una disbiosis y, con ella, a una desregulación de todas estas funciones.

Objetivos:

Todos estos antecedentes han llevado al planteamiento de los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo renal en modelos celulares y en animales diabéticos.
2. Estudiar el efecto de los flavanoles del cacao sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo vascular en modelos celulares y en animales diabéticos.

Resumen

3. Estudiar el efecto de los flavanoles del cacao sobre la salud intestinal y la microbiota intestinal en animales diabéticos.
4. Estudiar el efecto antiinflamatorio de los flavanoles del cacao en modelos celulares y en animales diabéticos.

Resultados:

Los estudios renales *in vitro* han puesto de manifiesto que, en condiciones fisiológicas, la EC y el DHBA son capaces de regular la homeostasis glucídica en las células del túbulo proximal NRK-52E. Además, en situaciones patológicas (alta concentración de glucosa) la EC y el DHPAA previnieron la disfunción renal y el estrés oxidativo. Igualmente, en las investigaciones renales *in vivo*, para las que se han utilizado las ratas *Zucker obesas y diabéticas* (ZDF, de sus siglas en inglés *zucker diabetic fatty*), se ha observado que la administración de una dieta rica en cacao protege del daño renal modulando la homeostasis glucídica y el estrés oxidativo, y también activa la autofagia e inhibe la apoptosis. En cuanto al proceso inflamatorio presente en la T2D, el pretratamiento con la EC y el DHBA en las células NRK-52E tratadas con altas dosis de glucosa junto con el *lipopolisacárido* (LPS de sus siglas en inglés *lipopolysaccharide*), así como la ingesta de una dieta rica en cacao por parte de las ratas diabéticas, protegen del aumento de los niveles de proteínas relacionadas con el desarrollo del proceso inflamatorio (citoquinas proinflamatorias, moléculas de adhesión y estrés oxidativo).

Por otro lado, en las investigaciones con las células endoteliales EA.hy926 se ha observado que el pretratamiento con una mezcla de ácidos fenólicos derivados del metabolismo microbiano de los flavanoles del cacao protege de la disfunción endotelial y del estrés oxidativo. De igual manera en el modelo *in vivo*, la suplementación de los animales diabéticos con una dieta rica en cacao previene la rigidez arterial, el remodelado aórtico y el estrés oxidativo arterial. Ambos tratamientos, la mezcla de ácidos fenólicos y el cacao, también muestran efectos beneficiosos en el proceso inflamatorio de los modelos *in vitro* e *in vivo*. Más concretamente, el pretratamiento de las células EA.hy926 con la mezcla de metabolitos colónicos evita el aumento de las proteínas relacionadas con el proceso inflamatorio, así como el incremento de la adhesión de monocitos. Por su parte, el tratamiento de las ratas diabéticas con una dieta rica en cacao protege del aumento de las moléculas de adhesión y de los marcadores proinflamatorios.

Por último, el estudio de las poblaciones microbianas y de la morfología colónica ha mostrado una modificación de la composición de la microbiota intestinal hacia un perfil microbiano más saludable en las ratas diabéticas que

recibieron una dieta rica en cacao, la cual podría estar asociada con la mejora de la homeostasis glucídica y de la salud intestinal.

Conclusiones:

En resumen, todos estos resultados obtenidos en los estudios en cultivos celulares endoteliales y renales, así como los obtenidos en los animales de experimentación ponen de manifiesto que el cacao, sus flavanoles y sus metabolitos colónicos podrían ser capaces de proteger frente al desarrollo y progreso de importantes complicaciones diabéticas, ya que son capaces de aliviar el estrés oxidativo, la disfunción renal, la remodelación aórtica y la inflamación inducida por la situación diabética. Así mismo, el cacao parece modificar la composición de la microbiota intestinal hacia un perfil microbiano más saludable en la T2D.

Introduction:

Type 2 Diabetes (T2D) is considered as one of the pathologies with the highest incidence worldwide and it is characterized by insulin resistance, and a defect in its secretion, which leads to high levels of glycaemia, and tissue glucotoxicity. This hyperglycaemia affects numerous signal transduction pathways and promotes the imbalance of the redox state, leading to the onset of diabetic complications, including macrovascular complications (vascular endothelium alterations) and microvascular complications (nephropathy, and others). In this line, dietary polyphenols (such as those present in cocoa), and phenolic acids derived from their microbial metabolism could prevent these alterations due to their antioxidant, antidiabetic and anti-inflammatory properties. These biological activities of polyphenols are attributed to pure compounds, such as *epicatechin* (EC), as well as to their colonic metabolites coming from their microbial metabolism in the gut, such as *2,3-dihydroxybenzoic acid* (DHBA), *3,4-diphenylhydroxyacetic acid* (DHPAA) and *3-hydroxyphenylpropionic acid* (HPAA), which are the most abundant in urine and plasma after the intake of flavanol-rich foods. This feature makes the microbiome a key component for the development of the different properties of phenolic compounds. The gut microbiota participates in multiple body functions, among which it could be mentioned modulation of the immune system and the regulation of the intestinal permeability and the metabolism of nutrients. Thus, small changes in the composition of the gut microbiota could lead to dysbiosis and, with it, a deregulation of all these functions.

Objectives:

This background has led to the approach of the following objectives:

1. Study the effect of cocoa flavanols and their colonic metabolites on renal alterations in functionality and oxidative damage in experimental models.
2. Study the effect of cocoa flavanols on alterations in vascular functionality and oxidative damage in experimental models.
3. Study the effect of cocoa flavanols on gut health and microbiota in diabetic animals.
4. Study the anti-inflammatory effect of cocoa flavanols in experimental models.

Abstract

Results:

In vitro renal studies have shown that under physiological conditions, EC and DHBA are able to regulate the glucose homeostasis in proximal tubular NRK-52E cells. In addition, in pathological situations (high glucose concentration) EC and DHPAA prevent renal dysfunction and oxidative stress. Moreover, in the *in vivo* model, Zucker obese and diabetic (ZDF) it has shown that feeding the animals with a cocoa-rich diet protects against kidney damage by modulating glucose homeostasis and oxidative stress, and activates autophagy and inhibits apoptosis. With regard to the inflammatory process, pretreatment with EC and DHBA in NRK-52E cells exposed to high doses of glucose in combination with LPS, as well as the intake of a cocoa-rich diet by diabetic rats protect against increased levels of proteins related to the development of the inflammatory process (proinflammatory cytokines, adhesion molecules and oxidative stress).

On the one hand, in endothelial cells EA.hy926 the pretreatment with a mixture of phenolic acids derived from the microbial metabolism of cocoa flavanols protects against endothelial dysfunction and oxidative stress. Similarly, in the *in vivo* model, supplementation of diabetic animals with a cocoa-rich diet prevents arterial stiffness, aortic remodeling and arterial oxidative stress. Both treatments, the mixture of phenolic acids and cocoa have also shown beneficial effects on the inflammatory process in the *in vitro* and *in vivo* models. Particularly, the pretreatment of EA.hy926 cells with the mixture of colonic metabolites prevents the increase of proteins related to the inflammatory process, as well as the increase in monocyte adhesion. On the other hand, the treatment of diabetic rats with a cocoa-rich diet protects against increased adhesion molecules and proinflammatory markers.

Finally, the study of microbial populations and colonic morphology has shown a modification in the composition of the gut microbiota towards a healthier microbial profile in cocoa-fed diabetic rats, which could be associated with improved glucose homeostasis and gut health.

Conclusions:

In summary, all results obtained from endothelial and renal cultured cells, as well as those from experimental animals, show that cocoa, its flavanols and its colonic metabolites could be able to protect against the development and progress of important diabetic complications, as they seem to be able to alleviate oxidative stress, renal dysfunction, aortic remodeling and diabetic-induced inflammation. Likewise, cocoa seems to modify the composition of the gut microbiota to a healthier microbial profile in T2D.

1. Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos son moléculas orgánicas presentes mayoritariamente en los vegetales y cuyo consumo parece tener un efecto beneficioso sobre la salud y en ciertas patologías¹. Se encuentran principalmente en frutas y verduras, pero también tienen una notable presencia en alimentos como el chocolate y el aceite de oliva y en bebidas como el vino, el café y el té². La investigación en el campo de los compuestos fenólicos ha puesto de manifiesto que la ingesta de estos reduce el riesgo de padecer enfermedades metabólicas^{3,4}, antiinflamatorias⁵, cardiovasculares⁶, neurodegenerativas⁷ y cáncer⁸.

1.1. Estructura y clasificación.

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios de los vegetales y se caracterizan por tener en su estructura uno o varios anillos fenólicos unidos a grupos hidroxilos. Así, dependiendo del número de carbonos, los polifenoles se pueden dividir en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides⁹ (Tabla 1).

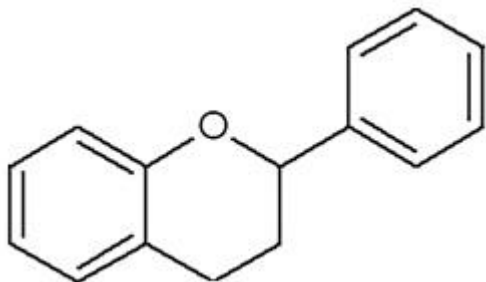
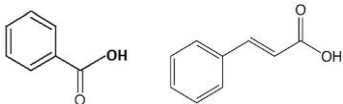
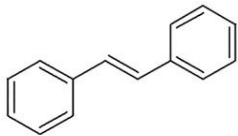
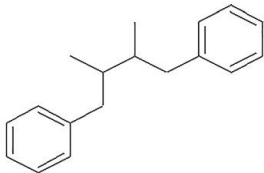
Flavonoides	No flavonoides	
	Ácidos fenólicos	
	Estilbenos	
	Lignanos	

Tabla 1. Clasificación de los compuestos fenólicos en base a su estructura (Adaptado de *Durazzo y colaboradores, 2019*⁹).

Introducción

1.1.1. Flavonoides.

Los flavonoides son aquellos compuestos fenólicos constituidos por quince carbonos; constan de dos anillos aromáticos, unidos entre sí por un puente de tres carbonos con capacidad para formar un heterociclo y en los alimentos se encuentran mayoritariamente glicosilados. Se distinguen seis grupos de flavonoides en función de los grupos químicos que se unan a los anillos aromáticos⁹ (Tabla 2).

Las **flavanonas** se encuentran en las verduras, como el tomate y la patata, en algunos tipos de especias, entre las que están el romero y la menta y, de manera más abundante aparecen en las frutas, más concretamente en el limón y la naranja. Dentro de este tipo de flavonoides cabe mencionar a la hesperetina y la naringenina⁹, habiéndose descrito para esta última un efecto protector frente al riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares¹⁰.

Las **flavonas** son componentes presentes en las verduras, como el perejil y la alcachofa. También se encuentran en productos como las aceitunas negras y en grandes cantidades en las frutas, como es el caso del mango y la papaya. Destacan en este grupo la luteolina y la apigenina⁹, la cual ha demostrado tener notables efectos beneficiosos frente a la diabetes y la enfermedad de Alzheimer¹¹.

Las **isoflavonas** se caracterizan por tener propiedades estrogénicas, lo que hace que sean conocidas como fitoestrógenos. Su distribución en los alimentos está muy localizada, ya que aparecen casi de manera específica en las legumbres, siendo la soja una fuente notable de estas. Entre las principales variantes de isoflavonas están la genisteína y la daidzeína⁹, que parecen contribuir en la atenuación de los síntomas asociados a la menopausia¹².

Las **antocianidinas** poseen una alta solubilidad en agua y dotan a las flores y las frutas de coloraciones como el rojo, el azul o el morado. Puesto que son las responsables de los colores vistosos de las frutas, su presencia está asegurada en alimentos como la fresa, la frambuesa y la ciruela. Entre los representantes de este tipo de flavonoides están la cianidina y la malvidina⁹, cuyo consumo parece estar relacionado con una reducción del número de muertes por infarto en pacientes con *enfermedad cardiovascular* (CVD, de sus siglas en inglés cardiovascular disease)¹³.

Los **flavonoles** están presentes en productos como el vino tinto y la cebolla, siendo ésta donde podemos encontrar las mayores cantidades de estos compuestos. Destacan principalmente el kaempferol y la quercetina⁹, la cual parece proporcionar efectos quimiopreventivos en pacientes con cáncer¹⁴.

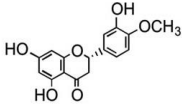
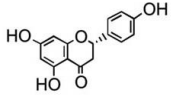
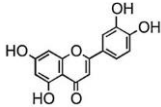
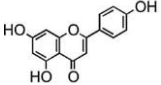
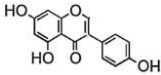
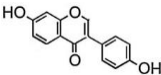
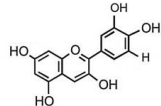
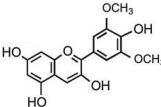
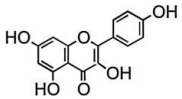
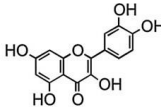
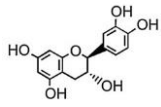
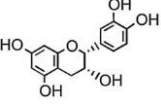
Flavanonas	Hesperetina	
	Naringenina	
Flavonas	Luteolina	
	Apigenina	
Isoflavonas	Genisteína	
	Daidzeína	
Antocianidinas	Cianidina	
	Malvidina	
Flavonoles	Kaempferol	
	Quercetina	
Flavanoles	Catequina	
	Epicatequina	

Tabla 2. Clasificación de los compuestos fenólicos de tipo flavonoides en base a su estructura (Adaptado de *Durazzo y colaboradores, 2019⁹*).

Introducción

Los **flavanoles** tienen la capacidad de interactuar con el ácido gálico, dando lugar a moléculas conjugadas como son: la *epicatequinagalato* (ECG), la *epigallocatequina* (EGC) y la *epigallocatequina-3-galato* (EGCG), que forman parte de alimentos como el té verde y el cacao⁹. Entre los flavanoles más abundantes se encuentra la catequina y la *epicatequina* (EC), estos monómeros poseen la propiedad de interaccionar entre sí, pudiendo dar lugar a polímeros denominados procianidinas¹⁵. Entre sus efectos más importantes sobre la salud estarían los de reducir el riesgo de sufrir enfermedades como la diabetes¹⁶, los problemas cardiovasculares¹⁷, disfunción renal¹⁸, la obesidad¹⁹, la artritis²⁰ o el cáncer²¹.

1.1.2. No flavonoides.

Los compuestos fenólicos considerados no flavonoides difieren de los anteriores en su estructura. En primer lugar, en el número de carbonos, ya que no presentan quince carbonos y, en segundo lugar, la distribución de dichos carbonos es diferente, ya que en este caso pueden formar uno o dos anillos aromáticos sin necesidad de formar un heterociclo entre ambos. Se distinguen tres grupos⁹ (Tabla 3).

Los **ácidos fenólicos** presentan un grupo carboxilo unido a un anillo aromático, y en función de dicho anillo se clasifican en dos grupos: ácidos fenólicos derivados del ácido benzoico y ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico⁹. Dentro del primer grupo está el ácido gálico, que se encuentra principalmente en el té negro, y que ha demostrado tener efectos beneficios en enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson²². Por otro lado, entre los derivados del ácido cinámico, cabe destacar el ácido clorogénico del café y el ácido p-cumárico presente en la cúrcuma. El primero se caracteriza por su capacidad protectora frente al daño renal en la *nefropatía diabética* (DN, de sus siglas en inglés diabetic nephropathy)²³, y la cúrcuma, por su lado, posee un potente efecto antiinflamatorio²⁴.

Los **estilbenos** poseen una estructura formada por dos anillos aromáticos entre los que se sitúan dos carbonos como puente de unión⁹. Dentro de los estilbenos más importantes se encuentra el resveratrol, abundante en el vino tinto, y entre sus efectos beneficiosos se le han atribuido la capacidad de reducir el riesgo de mortalidad provocado por la hipertensión, la diabetes y la obesidad²⁵, así como el de proteger de la aparición de ciertos tipos de cáncer²⁶.

Los **lignan**os están constituidos por dos unidades repetidas, formadas cada una de ellas por un ciclo aromático y tres carbonos que unen ambas unidades⁹. Existe una gran variedad de lignanos, pero cabe mencionar dos: el secoisolariciresinol y el matairesinol, ambos almacenados en grandes cantidades en las semillas oleaginosas (colza y sésamo). Por su estructura química se le atribuyen propiedades estrogénicas, lo que hace que se hayan relacionado con efectos quimiopreventivos en el cáncer de mama²⁷.

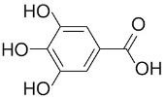
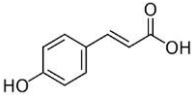
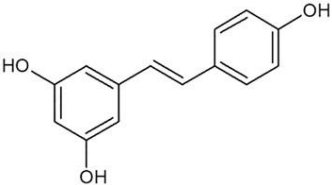
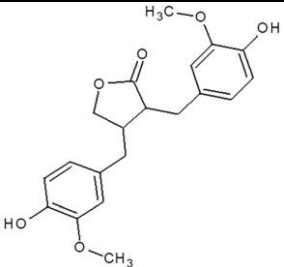
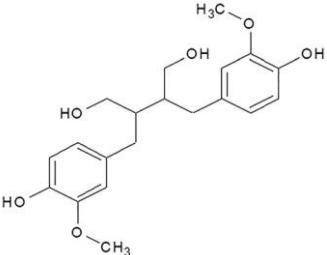
Ácidos fenólicos	Ácido gálico	
	Ácido p-cumárico	
Estilbenos	Resveratrol	
Lignanos	Matairesinol	
	Secoisolariciresinol	

Tabla 3. Clasificación de los compuestos fenólicos de tipo no flavonoides en base a su estructura (Adaptado de *Durazzo y colaboradores, 2019*⁹).

1.2. Ingesta, biodisponibilidad y metabolismo.

Para estimar la cantidad de polifenoles que se ha ingerido se cuenta con dos bases de datos²⁸. Por un lado está la perteneciente al *Departamento de Agricultura de los Estados Unidos*, que presenta limitaciones pues únicamente estima la cantidad de polifenoles de tipo flavonoides²⁹. Por otro lado, la base de datos *Phenol-Explorer* es más completa, ya que tiene en cuenta todos los tipos de polifenoles, así como sus conjugados³⁰. También es posible estimar la cantidad de polifenoles derivada de la ingesta de alimentos gracias a dos técnicas: *Folin-Ciocalteu*³¹ o *cromatografía líquida de alta presión* (HPLC, de las siglas en inglés high pressure liquid chromatography)³².

En cuanto a la ingesta diaria de polifenoles, uno de los principales continentes donde es mayor es en Europa, debido al tipo de dieta que presentan estos países. Un estudio elaborado en diez países europeos sobre los hábitos ha revelado que la ingesta media de polifenoles es de 1 g/día, siendo los polifenoles de tipo flavonoides los más consumidos³³. Sin embargo, no todos los polifenoles ingeridos van a poder ser utilizados por el organismo en su forma nativa, ya que son muchos los factores que van a influir en su biodisponibilidad. Entre estos factores se encuentran: la estructura química, la cantidad de alimento ingerido, el procesado del mismo, la interacción con otros alimentos, etc., y todo ello hace que los polifenoles sean considerados moléculas con una baja biodisponibilidad³⁴. Según el organismo americano para la *Administración de los Medicamentos y los Alimentos* la biodisponibilidad se define como la tasa de un compuesto con la que se absorbe y está disponible en su lugar de acción³⁵. Una vez los polifenoles han llegado al estómago, aquellos que no se encuentren glicosilados y que constituyen una pequeña porción, van a ser absorbidos, mientras que el resto, la gran mayoría, continuarán su circulación y serán absorbidos en el intestino delgado y el colon. Para poder llevar a cabo su absorción en ambos tejidos, los polifenoles van a sufrir una serie de reacciones metabólicas cuyo objetivo es eliminar los azúcares que llevan unidos, dando lugar a polifenoles en su forma aglicona³⁶ (Figura 1).

La primera modificación que van a sufrir los compuestos fenólicos es la desglicosilación. Los polifenoles de bajo peso molecular llegan al lumen intestinal, donde la enzima *lactasa-florizina hidrolasa* (LPH, de sus siglas en inglés lactase phlorizin hydrolase) va a actuar de manera específica sobre los flavonoides-O- β -D-glicosilados, liberando la parte glucídica y dando lugar a las agliconas que, por transporte pasivo, son capaces de introducirse en los enterocitos del intestino delgado. Sin embargo, algunos polifenoles son capaces de atravesar la membrana plasmática unidos a transportadores y llegar al citoplasma del epitelio intestinal, donde una enzima citosólica denominada *beta-glucosidasa citosólica* (CBG, de sus siglas en inglés cytosolic β glucosidase) va a generar las agliconas³⁷. Ambos procesos forman parte de

la llamada fase I del metabolismo de los polifenoles, que termina con la sulfatación, metilación y glucuronidación de las agliconas en el propio enterocito, para dar lugar a sus respectivos conjugados³⁸.

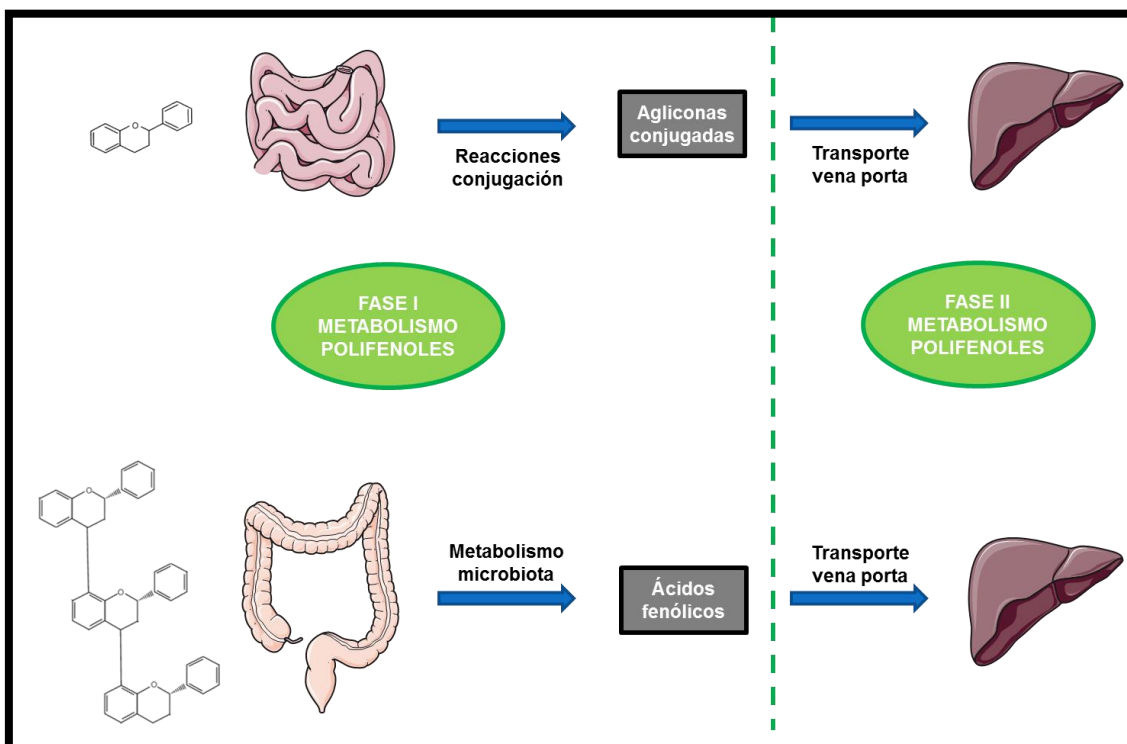


Figura 1. Esquema del metabolismo de los compuestos fenólicos.

Los polifenoles de alto peso molecular siguen una ruta muy distinta, ya que por su estructura no son capaces de atravesar la membrana del epitelio del intestino delgado y, por ello, alcanzan el colon donde sufren sucesivas reacciones metabólicas por la microbiota colónica³⁶. En el colon, los géneros bacterianos como *Bacteroides*, *Clostridium* o *Enterococcus* van a ser los encargados de llevar a cabo la hidrólisis de los polifenoles para dar lugar a las agliconas³⁹. Sin embargo, para que los colonocitos puedan absorber estas agliconas tienen que sufrir reacciones de desmetilación, descarboxilación, deshidroxilación y rotura del anillo aromático por parte de otro grupo de bacterias, dando lugar a los llamados ácidos fenólicos, como por ejemplo el *ácido-2,3-dihidroxibenzoico* (DHBA, de sus siglas en inglés 2,3-dihydroxybenzoic acid), el *ácido-3,4-dihidroxifenilacético* (DHPAA, de sus siglas en inglés 3,4-dihydroxyphenylacetic acid) y el *ácido-3,4-hidroxifenilpropiónico* (HPPA, de sus siglas en inglés 3,4-hydroxyphenylpropionic acid) y el *ácido vanílico* (VA, de sus siglas en inglés vanillic acid) (Tabla 4)⁴⁰.

Introducción

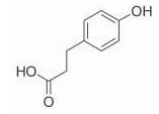
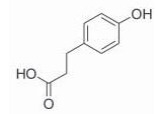
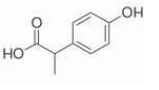
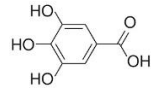
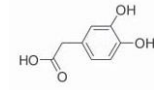
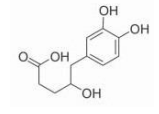
Clase	Subclase	Bacteria	Ácido fenólico
Flavanona	Naringenina	<i>Eubacterium ramulus</i>	 HPPA
Flavona	Apigenina	<i>Eubacterium ramulus</i>	 HPPA
Isoflavona	Genisteína	<i>Eubacterium ramulus</i>	 2-Ácido-4-hidroxifenilpropiónico
Antocianidinas	Malvidina	<i>Bifidobacterium animalis</i>	 Ácido gálico
Flavonoles	Quercetina	<i>Eubacterium ramulus</i>	 DHPAA
		<i>Flavonifractor plautii</i>	
Flavanoles	EC	<i>Flavonifractor plautii</i>	 Ácido valérico

Tabla 4. Clasificación de los compuestos fenólicos de tipo flavonoides en base a la formación de ácidos fenólicos (Adaptado de *Braune y colaboradores, 2016*⁴⁰).

La flora intestinal que posee cada individuo es de gran importancia, ya que un mismo sustrato puede ser metabolizado por grupos de bacterias distintas y, por tanto, dar lugar a ácidos fenólicos diferentes. Este es el caso de la daidzeína, que en función de la población bacteriana de cada individuo, metabolizará esta isoflavona en O-desmetilangolensina o en S-equol³⁹. A continuación, y una vez que el enterocito ha generado sus conjugados y el colonocito ha absorbido los ácidos fenólicos producidos por la microbiota, ambos tipos de moléculas van a llegar a la vena porta, a través de la cual alcanzarán el hígado³⁶. Estos metabolitos van a sufrir de nuevo modificaciones tales como la sulfatación, la metilación y la glucuronidación para generar nuevos conjugados; estas reacciones se incluyen dentro de la llamada fase II del metabolismo de los polifenoles⁴¹. Por último, tras la fase II, los conjugados resultantes van a pasar a la circulación sistémica, desde donde van a movilizarse hasta los tejidos diana y el riñón, para finalmente ser excretados³⁶. No obstante, y como se ha comentado anteriormente, la biodisponibilidad de los polifenoles es baja, lo que hace que en plasma se encuentren concentraciones del orden de 1 nM, pudiendo llegar hasta 10 µM si se analizan también los metabolitos conjugados⁴². Para hacer frente a este problema, se están desarrollando nuevas estrategias para aumentar la biodisponibilidad de los polifenoles, y todas ellas pasan por mejorar el sistema de absorción de los compuestos fenólicos. Entre estas estrategias cabe destacar el suministro oral de polifenoles encapsulados en nanopartículas lipídicas, en nanocristales y en liposomas, entre otros³⁴.

1.3. Actividad biológica.

Los polifenoles han demostrado tener efectos antioxidantes y, por ello, reducir el riesgo de padecer ciertas patologías³⁻⁸. Sin embargo, este efecto beneficioso no viene dado únicamente por su capacidad para minimizar el estrés oxidativo de la célula, ya que también son capaces de interactuar con múltiples receptores^{43,44} y regular cascadas de señalización celular^{45,46}.

1.3.1. Actividad antioxidante.

El metabolismo celular y los múltiples estímulos a los que se ven sometidas las células hacen que deba mantenerse una correcta homeostasis del estado redox, ya que un desequilibrio aumenta el riesgo de sufrir ciertas enfermedades⁴⁷. Por ello, los polifenoles han recibido una mayor atención en los últimos tiempos, ya que poseen una elevada capacidad para mantener y mejorar el estado redox de la célula mediante la modulación de las *proteínas quinasas activadas por mitógenos* (MAPKs, de sus siglas en inglés mitogen activated protein kinases) y las defensas antioxidantes^{48,49}.

1.3.2. Actividad antidiabética.

La *diabetes tipo 2* (T2D, de sus siglas en inglés type 2 diabetes) es una de las patologías con mayor incidencia mundial, lo que hace que sean muchos los estudios científicos que investigan nuevas estrategias para tratar de paliar dicha enfermedad. Los pacientes diabéticos presentan un cuadro clínico de resistencia a la insulina, defecto en la secreción de insulina, así como niveles altos de glucosa en el torrente circulatorio, lo que conduce a una glucotoxicidad tisular⁵⁰. Los polifenoles han demostrado tener un efecto beneficioso frente a esta patología, ya que son capaces de estimular la secreción de insulina, aumentar su sensibilidad, así como reducir los valores del *modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina* (HOMA-IR, de las siglas en inglés homeostatic model assessment insulin resistance) y los niveles de *hemoglobina glicosilada* (HbA1c)^{3,11,16,25}.

1.3.3. Actividad antiobesogénica.

La obesidad ha sido clasificada por la Organización Mundial de la Salud como una epidemia global de los países desarrollados, y se prevé que en diez años el 85% de la población mundial padecerá sobrepeso u obesidad. Se pueden distinguir cuatro tipos de obesidad en función del resultado de la relación entre el peso y la altura de cada individuo: individuos con sobrepeso (índice de masa corporal mayor a veinticinco), individuos con obesidad tipo I (índice de masa corporal mayor a treinta), individuos con obesidad tipo II (índice de masa corporal mayor a treinta y cinco) e individuos con obesidad tipo III o mórbida (índice de masa corporal mayor a cuarenta).

Esta patología es de tipo multifactorial y se caracteriza por una ingesta excesiva de calorías asociada a un gasto insuficiente de energía, lo que provoca un acúmulo de lípidos y, por consiguiente, lipotoxicidad tisular, lipotoxicidad sanguínea (elevados niveles de triglicéridos y colesterol) e inflamación⁵¹. En este sentido, se ha descrito que el mecanismo de acción de los polifenoles consiste en modular el metabolismo lipídico, ya que son capaces de inhibir a las enzimas encargadas de llevar a cabo la lipogénesis¹⁹, así como de reducir los depósitos lipídicos en el hígado²⁵ y los niveles de *lipoproteínas de baja densidad* (LDL, de sus siglas en inglés low density lipoprotein) circulantes entre otros⁴.

1.3.4. Actividad antiinflamatoria.

La inflamación crónica es un factor que está presente en la mayoría de las enfermedades crónicas y de mayor prevalencia mundial, como es el caso

de la diabetes, la obesidad o la arteriosclerosis⁵². El estado inflamatorio se caracteriza por una liberación exacerbada de citoquinas. Si bien los polifenoles, además de poner en marcha otros mecanismos de acción son capaces de disminuir los niveles de citoquinas al inhibir el *factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas* (NF-κB, de sus siglas en inglés nuclear factor κ light chain enhancer of activated B cells)⁵ y la *quinasa p38* (p38), entre otras vías²⁴.

1.3.5. Actividad cardioprotectora.

La CVD es una patología crónica y gradual que se acompaña de desórdenes en el corazón y el sistema circulatorio, provocados en su mayoría por la arteriosclerosis y el síndrome metabólico⁵³. Si bien, durante los primeros años de la enfermedad se puede presentar de manera asintomática. Esta enfermedad presenta una tasa de mortalidad muy elevada, estimándose que en diez años veintitrés millones de personas fallecerán a causa de ella cada año⁵³. La importancia de los polifenoles en la CVD viene dada por su potencial para reducir el proceso arteriosclerótico, ya que son capaces de inhibir la secreción de citoquinas inflamatorias y de aumentar las defensas antioxidantes⁶, así como de disminuir los valores de LDL en sangre¹⁰. Por otro lado, se ha descrito que los compuestos fenólicos son capaces de mejorar la salud cardiovascular y la función endotelial al aumentar la vasodilatación²⁵.

1.3.6. Actividad anticancerígena.

El cáncer es una enfermedad que afecta de manera global a la población mundial. Presenta una alta tasa de mortalidad y, así, en 2018, el cáncer provocó la muerte de más de nueve millones de personas. Los tipos de cáncer que fueron los principales responsables de estos fallecimientos fueron mayoritariamente el cáncer de pulmón en hombres y el de pecho en mujeres⁵⁴. El origen de esta patología está en una reprogramación celular que conduce a un crecimiento descontrolado de las células, lo que puede dar lugar a la aparición de una masa tumoral con una elevada capacidad angiogénica que favorecerá aún más su crecimiento. No obstante, ciertos compuestos parecen ser capaces de inhibir la formación de vasos sanguíneos antes mencionada y tan crucial en el crecimiento tumoral⁸. Además, estos compuestos naturales tienen otros efectos quimiopreventivos, ya que son capaces de inhibir la proliferación celular²⁷, inducir la autofagia y la apoptosis¹⁴, así como de prevenir la metástasis²⁶.

1.3.7. Actividad moduladora de la microbiota intestinal.

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que habitan en el tracto gastrointestinal, mayoritariamente en el colon, llegando a alcanzar cifras de más de mil especies distintas. Entre sus funciones está la de ayudar a digerir los alimentos y generar metabolitos, así como la de favorecer la formación de la mucosa intestinal y modular el sistema inmune⁵⁵. Por todo ello, la alteración de las poblaciones que la constituyen está relacionada con la aparición de diferentes patologías: diabetes⁵⁶, obesidad⁵⁷, CVD⁵⁸, daño renal⁵⁹, cáncer⁶⁰ y enfermedades neurodegenerativas⁶¹. Debido a que un alto porcentaje de los polifenoles ingeridos llegan al colon y sufren modificaciones, estos compuestos se sitúan como importantes moduladores de la microbiota colónica, capaces de modificar la composición de las especies bacterianas que la constituyen⁶².

1.3.8. Otras actividades.

Además de los efectos beneficiosos comentados anteriormente, a los compuestos fenólicos se les ha atribuido la capacidad de reducir el riesgo de padecer otras patologías. En el caso de ciertas enfermedades neurodegenerativas, al estar asociadas con la edad, los procesos prooxidantes ligados al envejecimiento se ven atenuados por la actividad antioxidante de los polifenoles, como sucede en el Alzheimer⁷ y el Parkinson²². La menopausia se caracteriza por episodios repentinos de calor y sudoración, acompañados de fragilidad ósea. Las isoflavonas, que presentan una estructura estrogénica, son capaces de interactuar con los receptores de los estrógenos y suavizar los síntomas mencionados¹².

2. Estrés oxidativo, inflamación y enfermedad.

En una situación de estrés oxidativo se produce un desequilibrio entre los agentes oxidantes y las defensas antioxidantes a favor de los primeros, causando un daño molecular. Entre los principales oxidantes se encuentran las *especies reactivas de oxígeno* (ROS, de sus siglas en inglés reactive oxygen species), derivados del metabolismo endógeno mitocondrial⁶³. En una situación fisiológica, las defensas antioxidantes son capaces de neutralizar los componentes oxidantes; sin embargo, cuando este equilibrio se rompe, ciertos agentes oxidantes causan daños en los lípidos, en el *ácido desoxirribonucleico* (ADN, de sus siglas en inglés deoxyribonucleic acid) y en las proteínas. Así, en una situación de estrés oxidativo se alteran rutas de señalización celulares, lo que puede conducir a la aparición de ciertas enfermedades y viceversa, ya que ciertas patologías producen el desequilibrio de este balance⁶⁴. A modo de

ejemplo, los altos niveles de los ROS se relacionan con la activación del NF- κ B, lo que desencadena el inicio del proceso inflamatorio⁶⁵.

2.1. Especies reactivas de oxígeno.

La mitocondria es el orgánulo celular encargado de la generación de energía, en forma de *adenosina trifosfato* (ATP, de sus siglas en inglés adenosine triphosphate), gracias a reacciones de oxidación y reducción de metabolitos derivados del metabolismo celular⁶⁶. En su membrana interna se encuentran cuatro complejos proteicos: la *nicotinamida adenina dinucleótido oxidasa* (NOX, de sus siglas en inglés nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase), la succinato oxidorreductasa y dos citocromos. Estos complejos son responsables de la reducción del oxígeno mediante la transferencia de electrones, generando ROS. La NOX es la mayor fuente de producción de los ROS, generando moléculas como el *radical hidroxilo* (\cdot OH), el *anión superóxido* (O_2^-) y el *peróxido de hidrógeno* (H_2O_2), llegando a alcanzar estas últimas concentraciones intracelulares de 1-10 nM⁶⁷. Existen cinco isoformas distintas de la enzima NOX. Todas las isoformas están ancladas a la membrana y presentan una estructura similar, sin embargo, difieren en las señales por las que son activadas y en su localización tisular (Tabla 5)⁶⁸. El exceso de los ROS se relaciona con el daño a las principales biomoléculas de las células⁶⁹. En este sentido, una de las macromoléculas que pueden ser dañadas por los ROS son los lípidos, como los *ácidos grasos poli-insaturados* (PUFAs, de sus siglas en inglés polyunsaturated fatty acids), que pueden sufrir un proceso oxidativo conocido como peroxidación lipídica. Los productos resultantes de esta peroxidación son mayoritariamente dos: el *malondialdehído* (MDA, de sus siglas en inglés malondialdehyde) y el *4-hidroxi-2-nonenal* (HNE, de sus siglas en inglés 4-hydroxynonenal)⁷⁰. El acúmulo de estas moléculas lleva asociada la activación de ciertas rutas celulares; así, en el caso del HNE se ha visto que la presencia de grandes cantidades de este compuesto se relaciona con un aumento de la apoptosis celular⁷¹, pero cuando el acúmulo es del MDA, la ruta activada es la inflamatoria⁷².

Los ROS también son capaces de oxidar a las proteínas, a los grupos sulfuro de las metioninas y cisteínas de su cadena lateral, provocando la modificación de su estructura y la pérdida de su función. Sin embargo, estas oxidaciones no siempre se producen de manera azarosa, ya que existen ciertas proteínas, como la albúmina sérica, en la que la oxidación se va a realizar en lugares específicos, permitiendo que la proteína siga manteniendo su función y, por ello, esta proteína se considera una defensa antioxidante⁷³. Por otro lado, cuando la oxidación de las proteínas se ve acompañada de su reacción con glúcidos (reacción de Maillard) se generan *productos finales de glicosilación avanzada* (AGEs, de sus siglas en inglés advanced glycation end products)⁷⁴.

Introducción

Estos subproductos poseen la capacidad de interaccionar con receptores de membranas específicos, denominados *receptores de productos finales de glicosilación avanzada* (RAGEs, de sus siglas en inglés receptor advanced glycation end products); esta unión al receptor provoca la activación de una cascada de señalización propia que desencadena dos fenómenos: el proceso inflamatorio mediante la activación del NF- κ B⁷⁵, y el proceso oxidativo mediante la activación de las *quinasas reguladas por señales extracelulares* (ERKs, de sus siglas en inglés extracellular signal regulated kinases), unas de las principales MAPKs⁷⁶.

El ADN también es susceptible de ser alterado por la actuación de los ROS, provocando la aparición de mutaciones, como es el caso de la base nitrogenada guanosina, que una vez oxidada genera 7,8-dihydro-8-oxoguanina, biomarcador del daño oxidativo al ADN⁷⁷. Las células eucariotas poseen material genético tanto en el núcleo como en la mitocondria y ambos pueden ser dañados por los ROS. Sin embargo, puesto que en la mitocondria se generan elevados niveles de estas especies, es su ADN el que sufre la mayor parte de las oxidaciones, y son responsables del desarrollo de enfermedades neurodegenerativas⁷⁸. Por otro lado, en el ADN nuclear, relacionado con los procesos de división celular, las mutaciones sufridas por las oxidaciones en sus bases se relacionan con el inicio del proceso tumoral. En este sentido, la presencia de un exceso de los ROS en las células puede conllevar la modificación de los genes supresores de tumores, lo que provoca que se inicie el proceso carcinogénico, así como la creación de un ambiente prooxidante que genera inestabilidad genética, lo que de manera genérica se asocia con el aumento del potencial metastásico⁷⁹.

Isoforma	Señales activadoras	Tipo celular
NOX-1	RAC1, p22 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox}	Célula colónica
NOX-2	RAC1, p47 ^{phox} , p67 ^{phox}	Célula fagocítica
NOX-3	p22 ^{phox} , p47 ^{phox} , p67 ^{phox}	Célula ciliada oído
NOX-4	p22 ^{phox}	Célula renal
NOX-5	Calcio intracelular	Ubicua

Tabla 5. Clasificación de las isoformas de la NOX de acuerdo con su activación y expresión celular (Adaptado de *Moloney y colaboradores, 2018*⁶⁸).

2.2. Defensas antioxidantes.

Los procesos metabólicos mitocondriales conducen a la generación de los ROS en elevadas concentraciones, lo que resulta en la activación de las defensas antioxidantes para que se mantenga la homeostasis redox^{63,64}. Estas defensas antioxidantes se pueden clasificar en dos: defensas no enzimáticas y enzimáticas.

2.2.1. Defensas antioxidantes no enzimáticas.

El **glutathion** es la principal defensa antioxidante no enzimática citoplasmática y se caracteriza por su capacidad de interconversión entre su forma oxidada y reducida. El *glutathion reducido* (GSH, de sus siglas en inglés glutathione) está formado por la unión de tres aminoácidos no esenciales: glutamato, cisteína y glicina; para ello, se va a unir en primer lugar el glutamato con la cisteína, gracias a la glutamilcisteína sintasa. A continuación, el péptido resultante se va a unir a la glicina por medio de la glutathion sintasa⁸⁰. La síntesis del GSH se realiza en un 90% en el hígado, donde llega a alcanzar concentraciones de 10 mM en los hepatocitos, y desde donde viaja al resto de los tejidos. Así, cuando los ROS intracelulares alcanzan niveles elevados, el GSH se oxida a *glutathion oxidado* (GSSG, de sus siglas en inglés glutathione oxidized), realizando así su acción antioxidante. El GSH tiene una capacidad de interconversión redox y el GSSG va a ser capaz de retornar a su estado reducido gracias a la donación de protones y electrones por parte de la *nicotinamida adenina dinucleótido fosfato* (NADPH, de sus siglas en inglés nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)⁸¹. La relación intracelular entre las formas reducida/oxidada se aproxima a 100 unidades de GSH por cada unidad de GSSG; sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo, este equilibrio se desplaza hacia la forma oxidada, y si este desequilibrio perdura en el tiempo, puede conducir a patologías como la diabetes⁸².

2.2.2. Defensas antioxidantes enzimáticas.

Las defensas antioxidantes enzimáticas engloban a un conjunto de enzimas que actúan de manera acoplada cuando el citoplasma celular acumula altas concentraciones de los ROS. Por un lado estarían las relacionadas con el metabolismo del glutathion, y entre ellas destacan la *glutathion peroxidasa* (GPx, de sus siglas en inglés glutathione peroxidase) y la *glutathion reductasa* (GR, de sus siglas en inglés glutathione reductase) y, por otro lado, están las enzimas encargadas de detoxificar directamente el O_2^- y H_2O_2 , como la *superóxido dismutasa* (SOD, de sus siglas en inglés superoxide dismutase) y la *catalasa* (CAT, de sus siglas en inglés catalase) (Tabla 6)⁸³.

Introducción

La **GPx** pertenece a la familia de las enzimas con carácter reductor, ya que es capaz de catalizar la transformación de los hidroperóxidos orgánicos en sus alcoholes correspondientes, y para ello necesita acoplar la reacción de oxidación del GSH en GSSG⁸⁴.

La **GR**, por el contrario, se encarga de reciclar el GSH. Es la responsable de reducir el GSSG en GSH, a expensas de la oxidación acoplada del NADPH⁸¹.

La **SOD** parece ser la primera línea de defensa frente al O_2^- , ya que es capaz de transformar esta molécula en O_2 y H_2O_2 ; para ello necesita de la participación de sus átomos del centro activo, más concretamente del cobre y del zinc⁸⁵.

La **CAT** guarda una estrecha relación con el H_2O_2 , ya que cataliza la detoxificación de este en H_2O ; cataliza la transferencia del oxígeno del H_2O_2 al grupo hemo de la enzima, proceso que se revierte con la llegada de una nueva molécula de H_2O_2 ⁸⁶.

Defensas antioxidantes	Reacción química
GPx	$2GSH \rightarrow GSSG + H_2O$
GR	$GSSG + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
SOD	$2O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
CAT	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$

Tabla 6. Clasificación de las principales defensas antioxidantes según la reacción química que catalizan (Adaptado de *Chen y colaboradores, 2018*⁸³).

2.3. Proceso inflamatorio.

La inflamación es el proceso fisiológico resultante de la liberación de citoquinas proinflamatorias por parte de las células del sistema inmune⁸⁷. Entre los factores que pueden activar el sistema inmune innato y, por tanto, incrementar la respuesta inflamatoria, se encuentran las infecciones, el estrés, el metabolismo oxidativo, la dieta y la alteración de la microbiota intestinal⁸⁸.

El proceso inflamatorio se inicia con la modulación de los macrófagos, que van a diferenciarse en dos tipos: los *macrófagos clásicos* (M1), encargados de liberar citoquinas proinflamatorias como la *interleuquina 1 beta* (IL-1 β , de sus siglas en inglés interleukin 1 β), la *interleuquina 6* (IL-6, de sus siglas en inglés interleukin 6) o el *factor de necrosis tumoral alfa* (TNF- α , de sus siglas en inglés

tumor necrosis factor α); y los *macrófagos alternativos* (M2) que, por el contrario, van a liberar citoquinas de tipo antiinflamatorio como la *interleuquina 10* (IL-10, de sus siglas en inglés interleukin 10), la *interleuquina 12* (IL-12, de sus siglas en inglés interleukin 12) y el *factor de crecimiento transformante beta* (TGF- β , de sus siglas en inglés transforming growth factor β) (Tabla 5)⁸⁹. Así, durante el proceso inflamatorio, las citoquinas proinflamatorias liberadas actúan sobre las células, induciendo en estas la sobreexpresión de moléculas de adhesión superficial como la *molécula de adhesión intercelular 1* (ICAM-1, de sus siglas en inglés intercellular adhesion molecule 1) y la *molécula de adhesión vascular 1* (VCAM-1, de sus siglas en inglés vascular cell adhesion molecule 1) mediante la activación del NF- κ B, lo que contribuye a permitir la extravasación de las células del sistema inmune⁹⁰. Sin embargo, la activación de esta ruta de señalización no va a regular únicamente la síntesis de estas moléculas de superficie, ya que para magnificar esta respuesta inflamatoria, el NF- κ B promueve que se generen nuevamente citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , quimioquinas como la *proteína de quimioatracción de monocitos 1* (MCP-1, de sus siglas en inglés monocyte chemoattractant protein 1) y enzimas como la *ciclooxigenasa 2* (COX-2, de sus siglas en inglés cytochrome C oxidase polypeptide 2), intensificando la respuesta inmune⁹¹.

Son muchos los factores que pueden desencadenar la respuesta inflamatoria, entre los que ha destacado recientemente la microbiota intestinal, cuya composición está íntimamente relacionada con el inicio de los procesos inflamatorios. Durante el envejecimiento, se producen alteraciones de la microbiota intestinal, aumentando algunos géneros y reduciéndose otros, lo que lleva consigo un incremento de la permeabilidad intestinal y, con ello, del ambiente inflamatorio⁹². Las células requieren de un elevado número de procesos metabólicos oxidativos para la obtención de energía, que llevan asociados la generación de los ROS y, en muchas ocasiones, el inicio del proceso inflamatorio. Sin embargo, este ambiente proinflamatorio no viene generado únicamente por los ROS, ya que las enzimas que catalizan dichos procesos oxidativos también están íntimamente relacionadas con la activación del inflamosoma⁹³.

2.4. Mecanismos antiinflamatorios.

El proceso inflamatorio puede desencadenarse por múltiples factores, pero existen unos mecanismos reguladores precisos para dicho proceso. Así, hay mecanismos de señalización que están fuertemente modulados por la inflamación, como es el caso de la vía de las MAPKs y la enzima COX-2, que son inhibidas con el objetivo de reprimir la respuesta inflamatoria⁹⁴. En las células, hay que destacar a la *interleuquina 4* (IL-4, de sus siglas en inglés interleukin 4), cuya actividad antiinflamatoria viene dada por su capacidad para

Introducción

favorecer la diferenciación de los macrófagos en M2 y de los linfocitos en *linfocitos colaboradores de tipo 2* (TH₂, de sus siglas en inglés T helper cells), siendo ambos tipos celulares los encargados de atenuar la respuesta inflamatoria⁸⁹.

2.5. Vías de señalización celular.

El estrés oxidativo y la inflamación son dos procesos complejos que requieren de una regulación precisa de sus rutas de señalización para que la célula pueda llevar a cabo su funcionamiento de manera correcta. Estas vías moleculares se estructuran en forma de cascadas de señalización en las cuales las proteínas se van a ir activando y desactivando de manera secuencial.

2.5.1. Ruta de las MAPKs.

La ruta de las MAPKs se corresponde con una cascada de señalización intracelular en la que existen tres niveles enzimáticos que requieren de la fosforilación sucesiva de cada uno de ellos para su activación. Las primeras en activarse en respuesta a un estímulo extracelular son las *quinasas activadoras de quinasas activadoras de proteínas quinasas activadas por mitógenos* (MAPKKK, de sus siglas en inglés mitogen activated protein kinases kinases), que a continuación van a activar mediante fosforilación a las *quinasas activadoras de proteínas quinasas activadas por mitógenos* (MAPKK, de sus siglas en inglés mitogen activated protein kinases kinases). Por último, esta cascada de señalización va a finalizar en la fosforilación y, por tanto, activación de las MAPKs⁹⁵. Las MAPKs incluyen tres familias de proteínas quinasas entre las que se encuentran la p38, las *quinasas N-terminal de c-Jun* (JNKs, de sus siglas en inglés c-Jun N-terminal kinases) y las ERKs, todas ellas relacionadas con los procesos de inflamación, estrés oxidativo, desarrollo y proliferación celular (Figura 2)^{96,97}.

Entre las quinasas p38 se distinguen cuatro isoformas atendiendo a su estructura (Tabla 7), destacando entre todas ellas la *quinasa p38 alfa* (p38α), que se activa por señales como la radiación ultravioleta, los agentes de daño al ADN y los factores de crecimiento, regulando así procesos como la remodelación del citoesqueleto y la apoptosis^{98,99}.

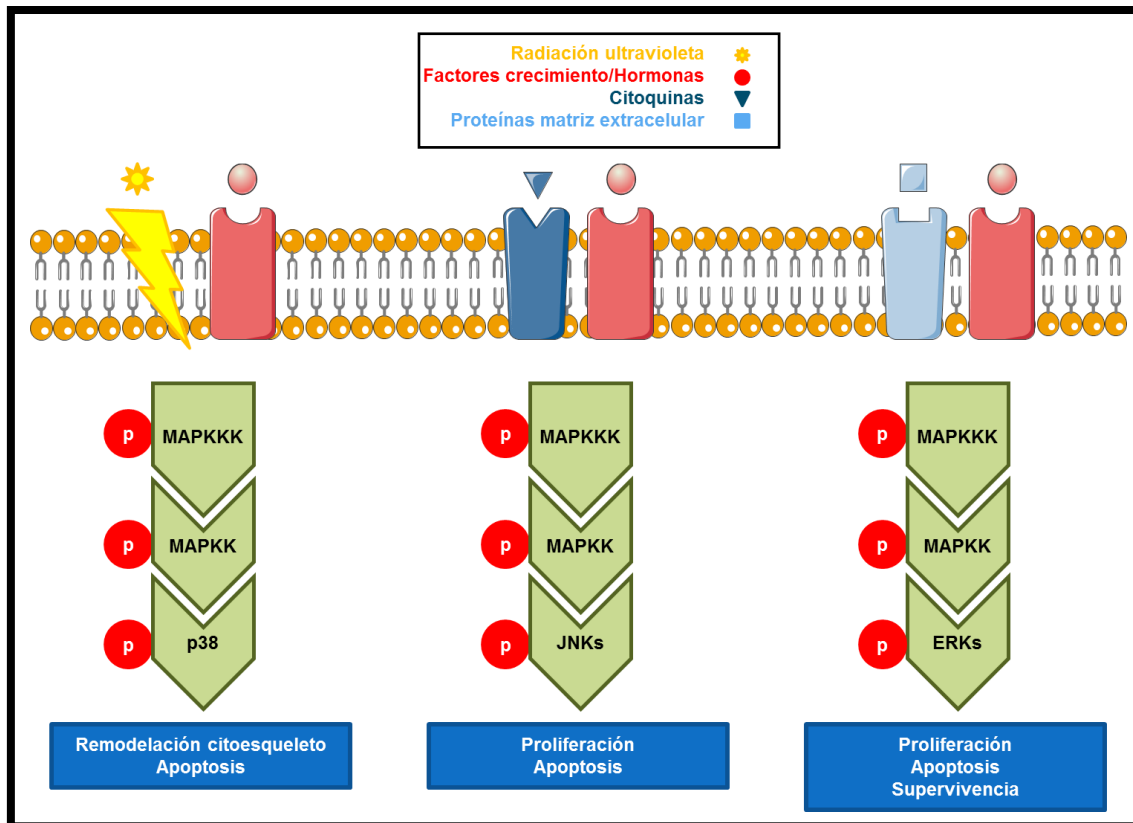


Figura 2. Esquema de la cascada de señalización de la ruta de las MAPKs.

En lo que se refiere a las JNKs, se distinguen tres isoformas (Tabla 7); todas ellas activadas por citoquinas, agentes de daño al ADN y factores de crecimiento; los cuales provocan la fosforilación y activación de factores de transcripción como c-Jun⁹⁹. Una vez se produce la fosforilación, este factor de transcripción va a regular la expresión de proteínas proapoptóticas, como la *caspasa 3* (Casp-3, de sus siglas en inglés caspase 3), la *caspasa 9* (Casp-9, de sus siglas en inglés caspase 9), la *proteína 4 similar a la proteína 2 de célula beta de linfoma* (Bax, de sus siglas en inglés Bcl 2 like protein 4), de proteínas antiapoptóticas, como la *proteína de célula beta de linfoma extra grande* (Bcl-x_L, de sus siglas en inglés B cell lymphoma extra large), y de proteínas relacionadas con la proliferación como el *antígeno nuclear de células en proliferación* (PCNA, de sus siglas en inglés proliferating cell nuclear antigen)¹⁰⁰. En cuanto a las ERKs, se distinguen dos isoformas (Tabla 6), ambas se activan por factores de crecimiento y proteínas de la matriz extracelular, lo que provoca que se transloquen al núcleo y activen factores de transcripción encargados de la expresión de proteínas relacionadas con los procesos de proliferación y supervivencia celular^{99,101}, entre otros.

MAPKs	Isoformas	Tipo celular
p38	p38 α	Ubicua
	p38 β	Célula cerebral
	p38 γ	Célula muscular esquelética
	p38 δ	Célula pancreática
JNKs	JNK1	Ubicua
	JNK2	Ubicua
	JNK3	Célula cerebral
ERKs	ERK1	Ubicua
	ERK2	Ubicua

Tabla 7. Clasificación de las isoformas de las MAPKs según su ubicación (Adaptado de *Corre y colaboradores, 2017*⁹⁹).

2.5.2. Ruta de la proteína quinasa B.

La ruta de señalización intracelular de la *proteína quinasa B* (PKB/AKT, de sus siglas en inglés protein kinase B) incluye a un conjunto de intermediarios moleculares, como los fosfatidilinositoles fosfato (PIP, de sus siglas en inglés phosphatidylinositol-3-phosphate); modificados por la *fosfatidilinositol-3-quinasa* (PI3K, de sus siglas en inglés phosphatidylinositol-3-kinase) y la *fosfatasa homóloga de la tensina* (PTEN, de sus siglas en inglés phosphatase and tensin homolog).

La cascada de señalización comienza con la activación de PI3K por señales extracelulares (citoquinas, factores de crecimiento u hormonas), lo que provoca la fosforilación del *fosfatidilinositol-3,4-bifosfato* (PIP2, de sus siglas en inglés phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) para dar lugar al *fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato* (PIP3, de sus siglas en inglés phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate), finalizando con el reclutamiento de AKT y su posterior activación por parte de otras proteínas¹⁰². La fosforilación y activación de AKT se relaciona con procesos de proliferación, supervivencia y homeostasis glucídica. Estos procesos pueden regularse parcialmente por la generación de los ROS, ya que son capaces de modular a la AKT (Figura 3)^{102,103}.

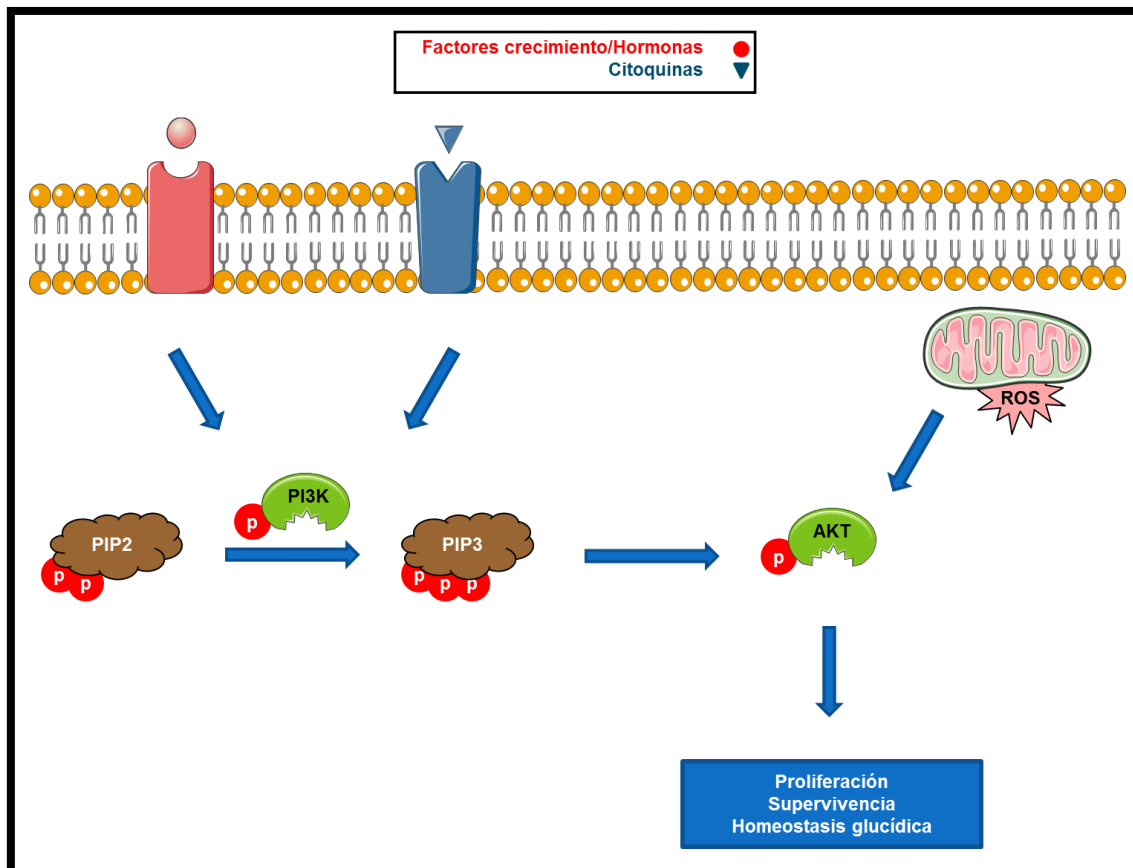


Figura 3. Esquema de la cascada de señalización de la ruta de la AKT.

2.5.3. Ruta de la sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD.

La *sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD* (SIRT-1, de sus siglas en inglés NAD-dependent deacetylase sirtuin-1) pertenece a la familia de las llamadas proteínas desacetilasas de histonas dependientes del cofactor *nicotín adenín dinucleótido* (NAD^+). Se han descrito siete isoformas distintas de esta proteína.

La importancia de esta proteína reside en su capacidad para desacetilar histonas, lo que provoca una modificación de la compactación del ADN y, por tanto, una regulación transcripcional de ciertos genes; además, es capaz también de desacetilar e inactivar proteínas no histónicas, como el NF- κB ¹⁰⁴. SIRT-1 va a responder ante situaciones de estrés y toxicidad generadas por estímulos nutricionales e infecciones, ya que es un sensor de ayuno y de sobrecarga nutricional, lo que hace que se inactive por los ROS y se le atribuya un papel antiinflamatorio, antiapoptótico, antienvjecimiento y antioxidante (Figura 4)^{104,105}.

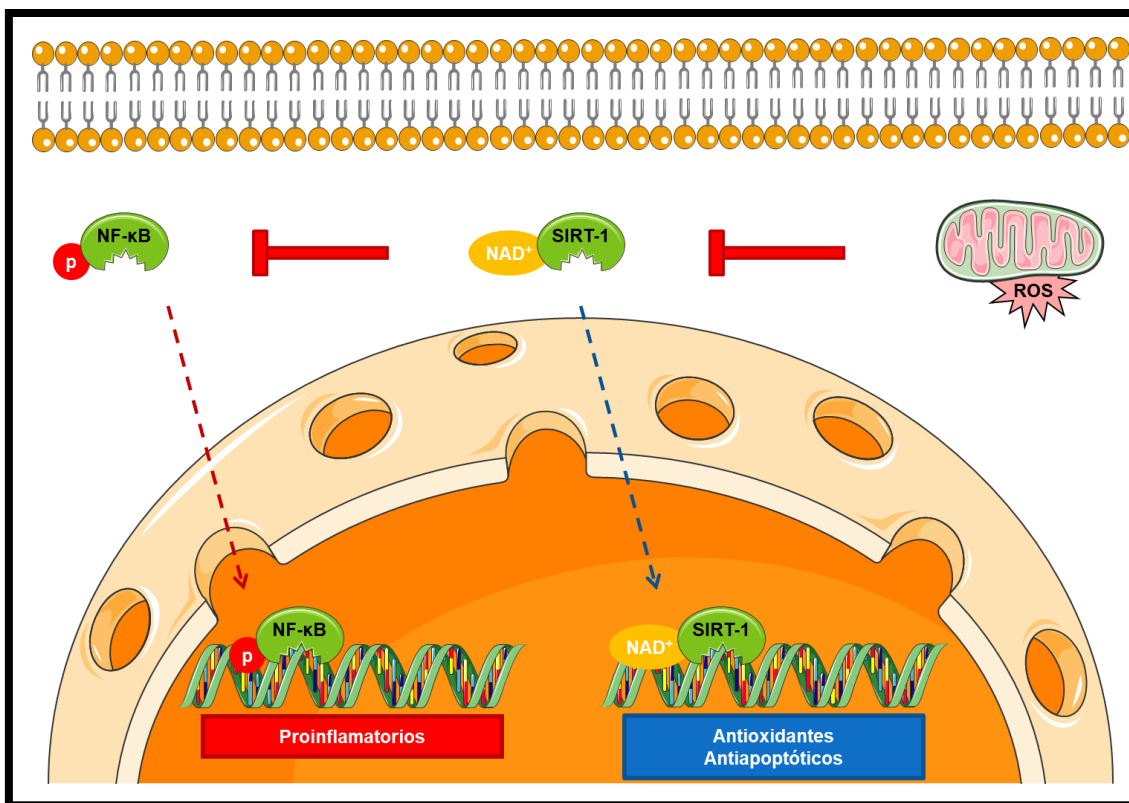


Figura 4. Esquema de la cascada de señalización de la ruta de la SIRT-1.

2.5.4. Regulación de los factores de transcripción relacionados con el estrés oxidativo.

El **NF-κB** es una proteína que pertenece a la familia de los factores de transcripción inducibles y tiene la capacidad de regular la expresión de genes involucrados en procesos inflamatorios y de inmunidad. El NF-κB modula numerosos genes, por lo que su activación debe estar perfectamente regulada y en ello participan dos familias de proteínas que controlan la translocación de este factor al núcleo: las *proteínas inhibidoras del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas* (IκB, de sus siglas en inglés inhibitor of κB) y las *quinasas de las proteínas inhibidoras del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas* (IKK, de sus siglas en inglés IκB Kinase)¹⁰⁶.

Las proteínas IκB, se unen al NF-κB y evitan que pueda translocarse al núcleo y desarrollar su función. Por otro lado, la IKK se encarga de fosforilar a IκB, provocando que se separe de NF-κB y este pueda translocarse al núcleo¹⁰⁶. Así, en la célula, las citoquinas inflamatorias y los factores de crecimiento estimulan una cascada de señalización intracelular que finaliza con la unión del NF-κB al ADN y la expresión de genes proinflamatorios; al igual que los ROS, capaces de inducir la fosforilación del IκB y permitir al NF-κB realizar su función; esta es, la llamada ruta canónica (Figura 5)^{106,107}.

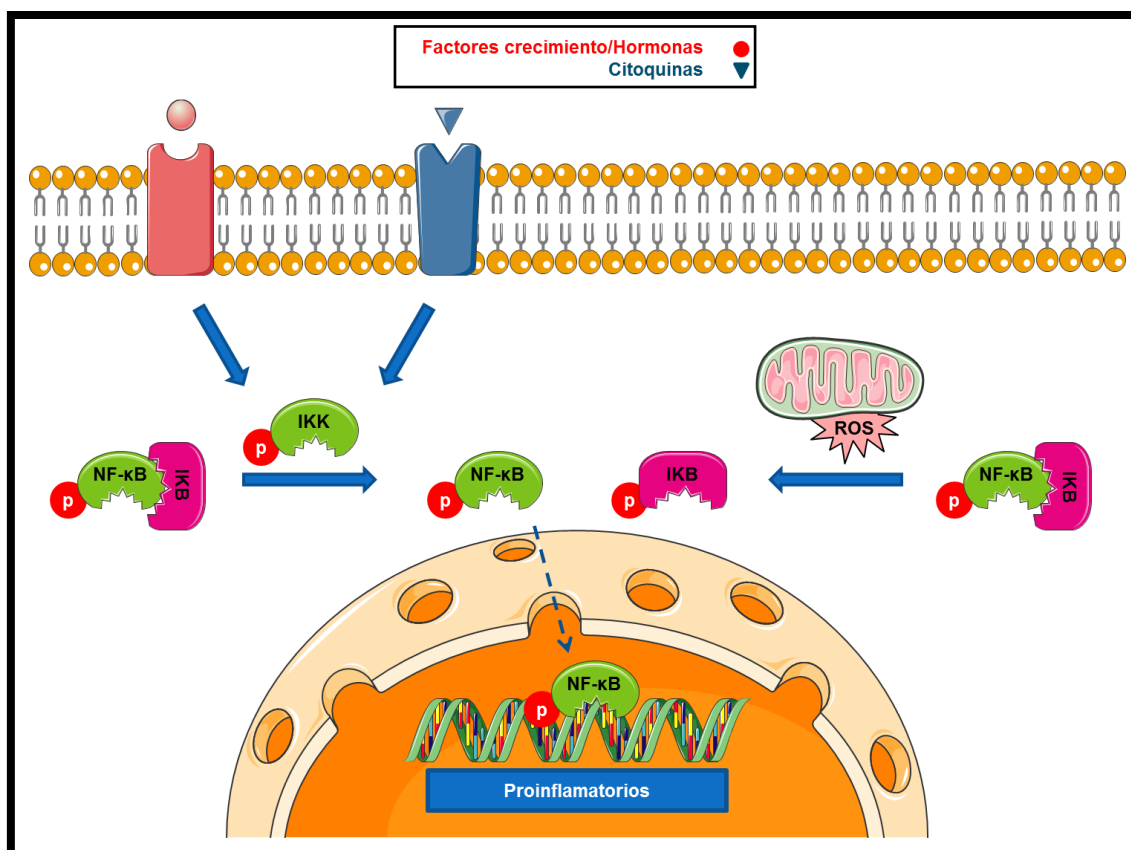


Figura 5. Esquema de la cascada de señalización de la ruta del NF-κB.

Por otro lado, el *factor de transcripción relacionado con el factor nuclear eritroide-2* (**Nrf2**, de sus siglas en inglés nuclear factor erythroid 2 related factor 2) es una proteína con función reguladora de la expresión génica capaz de translocarse al núcleo para unirse a secuencias específicas del ADN denominadas *elementos de respuesta antioxidantes* (AREs, de sus siglas en inglés antioxidant responsive element), lo que favorece la transcripción de genes relacionados con las defensas antioxidantes y de otras proteínas como el GSH.

Existen numerosos genes que expresan enzimas antioxidantes, sin embargo, el Nrf2 solo va a regular la síntesis de aquellos que tengan en su promotor a los ARE. Entre los genes modulados por el Nrf2 destacan los que dan lugar a la GPx, la GR, la SOD y la CAT⁸³. Ante situaciones de estrés oxidativo, los ROS van a provocar que el Nrf2 sea liberado de su secuestro citoplasmático, provocado por la asociación con la *proteína Kelch asociada a la proteína eritroide uno* (Keap-1, de sus siglas en inglés kelch like associated protein 1), y pueda unirse a los AREs, induciendo la transcripción de los genes relacionados con las defensas encargadas de mantener el ambiente antioxidante⁷⁹.

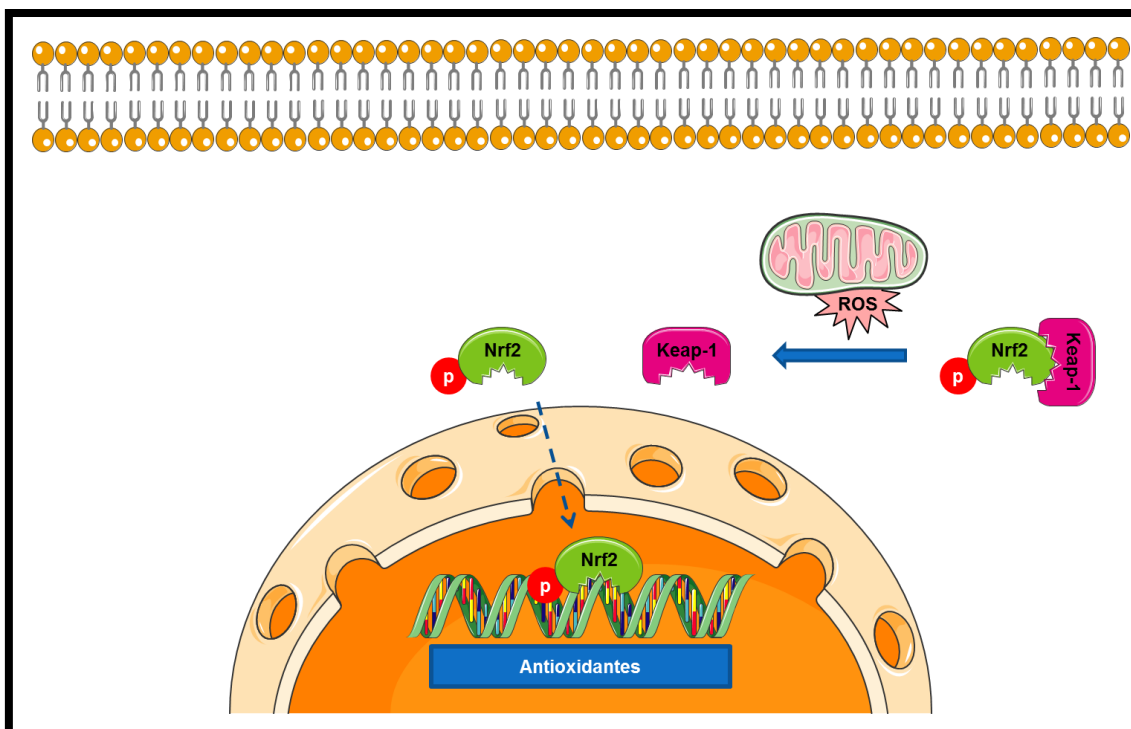


Figura 6. Esquema de la cascada de señalización de la ruta del Nrf2.

3. Diabetes.

3.1. Generalidades y clasificación.

La diabetes se ha convertido en una epidemia global, ya que se ha multiplicado por cuatro el número de afectados en los últimos cuarenta años; así, se estima que en el año 2035 habrá 590 millones de personas que padecerán la enfermedad, lo que va acompañado de un incremento en las cifras de obesidad y desórdenes metabólicos¹⁰⁸. La diabetes se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en sangre debido a la pérdida o deterioro de la masa de las células β pancreáticas, así como al desarrollo de resistencia a la insulina por parte de los tejidos.

El término diabetes engloba a cuatro tipos de patologías distintas: *diabetes tipo 1* (T1D), T2D, *diabetes mellitus gestacional* (GDM, de sus siglas en inglés gestational diabetes mellitus) y *diabetes de la edad madura que aparece en el joven* (MODY, de sus siglas en inglés maturity onset diabetes of the young)¹⁰⁹.

3.1.1. Diabetes tipo 1.

La T1D hace referencia a una enfermedad autoinmune crónica caracterizada por la destrucción de un 80-90% de la masa de células β de los islotes de Langerhans, lo que va acompañado de una deficiencia en la

secreción de insulina. Los pacientes afectados por esta patología (aproximadamente el 10% de todos los casos de diabetes) presentan una cierta predisposición genética al desarrollo de anticuerpos autorreactivos, los cuales inician la respuesta inmunitaria contra el páncreas, que desemboca en un estado de hiperglucemia constante y conduce a la aparición de las complicaciones macro- y micro-vasculares¹¹⁰.

3.1.2. Diabetes tipo 2.

La T2D es el subtipo de diabetes con una incidencia mayor mundial, ya que el 90% de los pacientes afectados de diabetes sufren esta patología. Se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina y una resistencia a esta por parte de los tejidos periféricos^{50,111}. Existen múltiples factores que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad, entre ellos cabe destacar a la obesidad, la inactividad física y la mala alimentación¹¹².

3.1.3. Diabetes mellitus gestacional.

La GDM se define como la diabetes materna que surge en el segundo o tercer periodo del embarazo sin haberse manifestado previamente y va acompañado de un incremento del riesgo de padecer T2D por parte del feto y de la madre¹¹³. Al igual que sucede con la T2D, los principales factores de riesgo para el desarrollo de la patología son el exceso de índice de masa corporal previo al embarazo, así como el sedentarismo y la mala alimentación¹¹⁴.

3.1.4. Diabetes de la edad madura que aparece en el joven.

La MODY corresponde a una patología que aparece en individuos menores de 25 años como consecuencia de la mutación de genes relacionados con la homeostasis glucídica, lo que provoca alteraciones en el metabolismo de la glucosa y la insulina. Entre los genes mutados destaca el que codifica para el factor nuclear hepático y el que codifica para la glucoquinasa¹¹⁵.

3.2. Metabolismo de los carbohidratos.

Los carbohidratos son las moléculas energéticas más usadas en el metabolismo celular que está modulado por rutas de señalización reguladas por hormonas que controlan la homeostasis glucídica. El hígado es uno de los principales órganos encargados de modular la síntesis y degradación de

Introducción

glucosa, ya que, junto con el riñón, son los dos órganos con capacidad gluconeogénica. En situación de ayuno, el glucagón secretado por las células α pancreáticas va a llegar al hígado, donde va a activar diferentes rutas de señalización que dan como resultado la liberación de glucosa hepática procedente del glucógeno (glucogenolisis) y la síntesis de glucosa a partir de precursores de tres carbonos (gluconeogénesis). Sin embargo, ante situaciones de ingesta es la insulina la que llega al hígado para modular cascadas intracelulares que desembocan en un incremento de la captación de glucosa hepática, seguida de una inhibición de la gluconeogénesis y de una activación de la síntesis de glucógeno (glucogenogénesis)¹¹⁶.

La insulina es una hormona que modula el metabolismo en muchos tejidos del organismo. Su ruta metabólica se inicia con su unión al *receptor de insulina* (IR de sus siglas en inglés Insulin Receptor) de la membrana plasmática de las células diana. Esta unión va a inducir la fosforilación del receptor y del *sustrato del receptor de insulina 1* (IRS-1, de sus siglas en inglés insulin receptor substrate 1) y, por consiguiente, la activación de la ruta de la AKT, cuyo objetivo es incrementar la translocación del *transportador de glucosa* (GLUT, de sus siglas en inglés glucose transporter) a la membrana plasmática.

Todo este proceso va a producir un aumento de la captación de glucosa por parte de las células diana y, por tanto, un efecto hipoglucemiante¹¹⁷. Además, la AKT también participa en la regulación glucogenogénica, ya que es la encargada de fosforilar e inhibir a la *glucógeno sintasa quinasa 3* (GSK3, de sus siglas en inglés glycogen synthase kinase 3) permitiendo que la *glucógeno sintasa* (GS, de sus siglas en inglés glycogen synthase) pueda activarse y promover así la glucogenogénesis¹¹⁸. Por último, para estimular la gluconeogénesis es necesario que se activen la *fosfoenolpiruvato carboxiquinasa* (PEPCK, de sus siglas en inglés phosphoenolpyruvate carboxykinase) y la *glucosa 6 fosfatasa* (G-6-Pasa, de sus siglas en inglés Glucose-6-Phosphatase), que a su vez necesitan del *factor de transcripción para las zonas con cabeza de horquilla* (FOXO, de sus siglas en inglés forkhead box), que es fosforilado y degradado en presencia de la AKT (Figura 7)¹¹⁹.

La homeostasis glucídica está controlada por la secreción de las dos hormonas anteriormente comentadas, por lo que es necesario que la liberación de la insulina por parte de la célula β pancreática esté regulada de manera precisa. La llegada de la glucosa a la célula β pancreática va a provocar la “apertura” del *transportador de glucosa 1* (GLUT1) y, por tanto, la entrada de glucosa al citoplasma y su ingreso en la glucólisis, lo que va a generar un aumento de las moléculas de ATP citoplasmáticas. Este incremento lleva asociado la apertura de los canales de potasio dependientes de ATP y, por tanto, la salida de este ion al espacio extracelular, despolarizando la membrana plasmática. En la célula β pancreática existen numerosos canales iónicos

anclados a la membrana, y muchos de ellos regulan su apertura dependiendo del voltaje, como el de calcio, lo que provoca que los iones calcio extracelulares entren a la célula, activando una cascada de señalización intracelular que finaliza con la exocitosis de las vesículas insulínicas. La secreción de insulina va a tener lugar en dos fases; en un primer momento, con la llegada de las primeras moléculas de glucosa se va a producir una pequeña liberación de los gránulos de insulina (primera fase), y con el paso de los minutos, la continua llegada de las moléculas de glucosa va a provocar que los acúmulos de insulina citoplasmáticos se liberen de manera más rápida y en cantidades mayores (segunda fase)¹²⁰. Sin embargo, la glucosa no es la única molécula capaz de activar la secreción de insulina, ya que en la membrana de las células β pancreáticas existen receptores para otros tipos de moléculas que también inducen la secreción de la hormona, como por ejemplo los ácidos grasos, los neurotransmisores y las incretinas¹²¹.

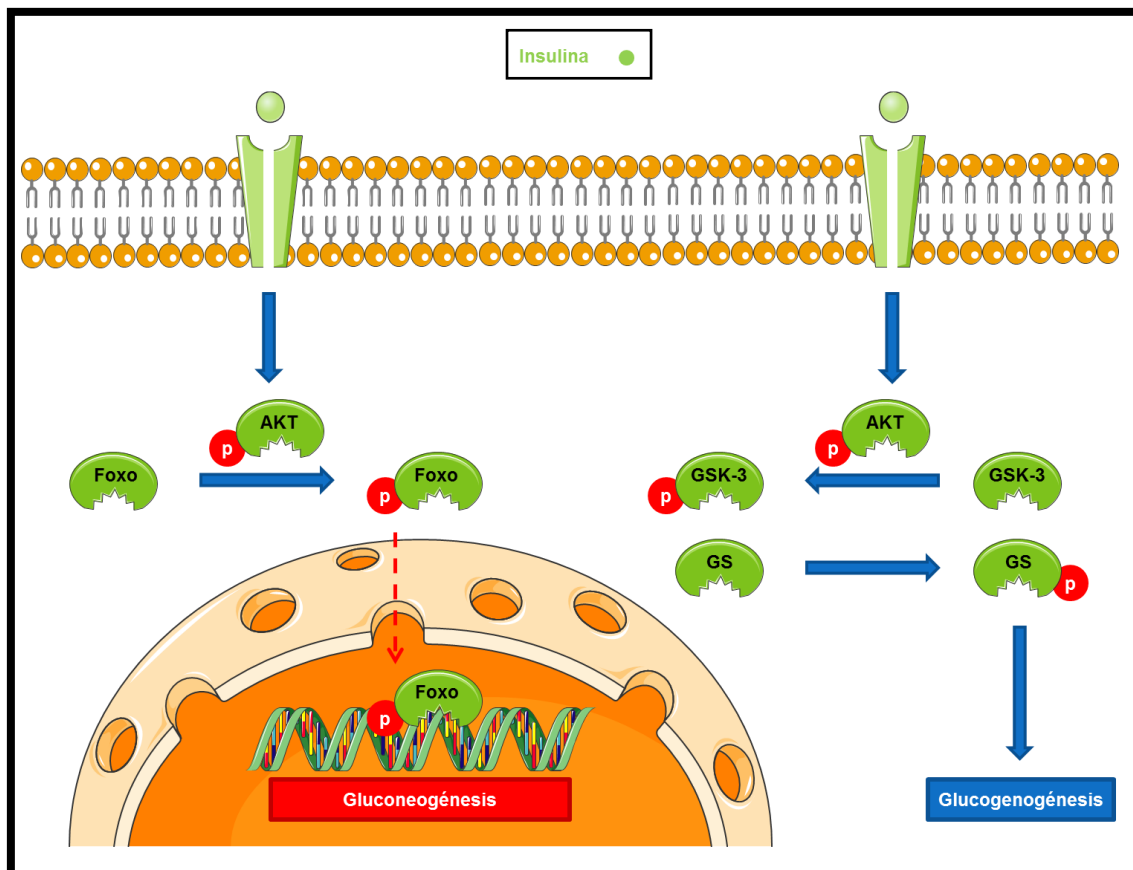


Figura 7. Esquema de la cascada de señalización de la homeostasis glucídica.

3.3. Fisiopatología.

Como se ha comentado anteriormente, la T2D se caracteriza por un defecto en la secreción de insulina y una resistencia a esta por parte de los tejidos periféricos¹¹¹. Los pacientes afectados de esta patología van a presentar una unión ineficaz de la insulina con el IR, lo que conduce a unos altos niveles de

Introducción

glucosa en la circulación sanguínea. Esta hiperglucemia hace que las células β pancreáticas secreten de manera continua y masiva gránulos de insulina, lo que finaliza con el agotamiento y disfunción de este tipo celular¹¹⁷. Sin embargo, estos pacientes con T2D no solo tienen alterado el sistema de secreción de la insulina, ya que se ha visto que presentan un incremento en la actividad de la GSK3 en el tejido muscular estriado esquelético¹¹⁸. La glucotoxicidad a la que se ven sometidos los tejidos del organismo debido a las elevadas concentraciones de glucosa que circulan por el torrente sanguíneo conducen a la larga a la aparición de las complicaciones diabéticas en muchos de estos tejidos. Estas complicaciones pueden clasificarse en dos tipos: las complicaciones macrovasculares (cardiopatías) y las complicaciones microvasculares (nefropatía, retinopatía y neuropatía)¹²².

Debido a que la principal causa que subyace en esta patología es el defecto en la señalización de la insulina, el tratamiento final para los pacientes afectados de T2D es la administración de insulina exógena¹²³. Uno de los estadios finales de la complicación diabética renal es la *enfermedad crónica renal* (CKD, de sus siglas en inglés chronic kidney disease); sin embargo, muchos de estos pacientes con T2D no pueden ser tratados con insulina, ya que presentan riesgos de sufrir episodios hipoglucemiantes, lo que hace que deban ingerir fármacos que inhiban al *cotransportador de sodio-glucosa 2* (SGLT-2) para promover la eliminación de la glucosa por vía urinaria¹²⁴.

3.4. Complicaciones diabéticas renales.

3.4.1. Fisiología renal.

Los riñones son los órganos encargados de la filtración y reabsorción sanguínea, procesos que finalizan con la excreción de los desechos no reabsorbidos. Por tanto, los riñones tienen un papel esencial en el control de los iones que circulan por el torrente sanguíneo, así como de la presión de este. La estructura renal se caracteriza por tener dos partes diferenciadas: una cubierta externa, que se denomina corteza renal, seguida de una parte interna denominada médula renal; ambas partes están constituidas por numerosas nefronas¹²⁵.

Las nefronas son cada una de las unidades funcionales que constituyen los riñones. Su estructura presenta dos zonas claramente diferenciadas: los glomérulos, encargados de la filtración sanguínea, y el epitelio tubular, encargado de la reabsorción hacia el torrente circulatorio. El glomérulo es la parte de la nefrona encargada de la primera filtración, y por ello, el conjunto de capilares sanguíneos fenestrados que alberga va a estar tapizado por unas células con prolongaciones citoplasmáticas llamadas podocitos, que están rodeados del mesangio. El conjunto de estas células va a constituir la

membrana basal glomerular (GBM, de sus siglas en inglés glomerular basement membrane), que va a ser la encargada de filtrar la sangre, permitiendo el paso del agua y ciertas moléculas hacia la cápsula de Bowman. A continuación, este filtrado inicial pasará al epitelio tubular¹²⁶. En esta segunda zona de la nefrona se distinguen cuatro porciones: el túbulo contorneado proximal, el asa de Henle, el túbulo contorneado distal y el túbulo colector. El túbulo contorneado proximal es el encargado de reabsorber aquellos glúcidos y aminoácidos que no deberían haber sido filtrados, mediante el GLUT y el SGLT, así como de llevar a cabo la gluconeogénesis. Por su parte, el asa de Henle y el túbulo contorneado distal tienen como función la reabsorción del agua y los iones y, por último, el túbulo colector va a ser el encargado de conducir ese filtrado final con sustancias de deshecho hacia la zona de excreción¹²⁶. Así pues, dado que la función renal consiste en su capacidad de filtración, es posible identificar la disfunción renal mediante el análisis de su ratio estimado de filtración glomerular (eGFR, de sus siglas en inglés estimated glomerular filtration rate), que corresponde con el volumen de fluido filtrado por unidad de tiempo¹²⁵.

3.4.2. Fisiopatología.

La DN, también conocida como *enfermedad diabética renal* (DKD, de sus siglas en inglés diabetic kidney disease), es una complicación diabética microvascular que afecta al 40% de los pacientes con T2D y que se caracteriza por una albuminuria progresiva y un incremento del eGFR, en las etapas iniciales de la enfermedad, seguida de un declive del eGFR y una disfunción renal. Son muchos los factores que aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad, sin embargo, destacan dos por encima del resto: la hiperglucemia y la hipertensión. En este sentido, el control de ambos puede reducir el riesgo de padecer DN en torno a un 30%¹²⁷. Esta complicación microvascular es una patología progresiva en la que se distinguen cinco estadios: de diagnóstico, silencioso, de DN inicial, de DN y de fallo renal (Tabla 8)¹²⁸. Todas estas etapas van acompañadas de alteraciones estructurales y moleculares de las nefronas¹²⁹. La función renal viene determinada en gran parte por la estructura del órgano, lo que hace que las alteraciones en su morfología se asocien con problemas en la función de filtración. Así, durante los primeros años de la enfermedad se produce un proceso de hipertrofia renal, la cual viene dada por el engrosamiento de la GBM y la expansión del mesangio, todo ello acompañado de la pérdida de la fenestración endotelial y de las células podocíticas. Además, la albuminuria persistente en el tiempo va a provocar el depósito de estructuras hialinas en los capilares, la cápsula de Bowman y el túbulo contorneado proximal¹²⁷.

Estadios DN	Consecuencias renales
I: Diagnósis	hiperfiltración
	hipertrofia
II: Silencioso	normofiltración
	microalbuminuria
III: DN inicial	normofiltración
	microalbuminuria
IV: DN	hipofiltración
	macroalbuminuria
V: Fallo renal	síndrome urémico

Tabla 8. Progresión de la DN y su fisiopatología (Adaptado de Ioannou y colaboradores, 2017¹²⁸).

La DN es una complicación diabética, lo que hace que el sistema renal esté expuesto a altos niveles de glucosa y a la formación continua de AGEs. Esta situación, unida a la exacerbada producción de los ROS por el incremento de la actividad mitocondrial resultante de la hiperglucemia, hace que en los riñones se genere un ambiente prooxidante. Como resultado se va a desencadenar la activación de la ruta de la *proteína quinasa C* (PKC, de sus siglas en inglés protein kinase C), de las MAPKs y del NF-κB, favoreciendo la síntesis de factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias y, a más largo plazo, hipertrofia renal¹³⁰. Además, la hiperglucemia que caracteriza a la diabetes va a provocar la activación de rutas de señalización que favorecen la expresión de los transportadores de membrana renales, como son los GLUT o los SGLT, provocando un aumento de la captación de glucosa por parte de las células del túbulo proximal¹²⁹. Así mismo, el estrés oxidativo y el desarrollo del proceso inflamatorio son factores determinantes en el aumento de la resistencia a la insulina y la producción de glucosa en pacientes con disfunción renal¹³¹.

3.5. Complicaciones diabéticas cardiovasculares.

3.5.1. Fisiología arterial.

El sistema cardiovascular está formado por el corazón y los vasos sanguíneos, estos últimos constituidos por tres capas concéntricas: la túnica íntima (capa interna), la túnica media (capa intermedia) y la túnica adventicia (capa externa). La túnica interna está constituida por células endoteliales que tapizan internamente el vaso sanguíneo e interaccionan directamente con todas las células del torrente circulatorio. La túnica media se compone de células musculares con capacidad contráctil y, por ello, se encarga de la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos, lo que hace que este bastante engrosada en las arterias. La capa más externa está formada por fibroblastos y se encuentra altamente comunicada con vasos y nervios¹³². Las células endoteliales que componen la túnica íntima son de vital importancia durante el proceso inflamatorio, ya que son las encargadas de interaccionar con células del sistema inmune que circulan por el torrente circulatorio y permitir su extravasación¹³³. Proyectadas hacia el lumen vascular, las células endoteliales exponen proteínas de membrana con capacidad de interaccionar con las células inmunitarias, destacando entre ellas la ICAM-1 y la VCAM-1¹³⁴. Sin embargo, no es esta su única función, ya que también son las encargadas de regular el tono vascular mediante la alternancia de los procesos de vasoconstricción y vasodilatación.

El principal agente encargado de la contracción vascular es la endotelina, molécula secretada por las células endoteliales y cuya síntesis se ve estimulada por la activación de la ruta del NF-κB, es decir, en situaciones proinflamatorias. Por otro lado, los procesos vasodilatadores se ven mediados por la molécula de *óxido nítrico* (NO, de sus siglas en inglés nitric oxide), secretada por la enzima *óxido nítrico sintasa* (NOS, de sus siglas en inglés nitric oxide synthase) en sus tres isoformas: *óxido nítrico sintasa neuronal* (nNOS, de sus siglas en inglés neuronal nitric oxide synthase), *óxido nítrico sintasa inducible* (iNOS, de sus siglas en inglés inducible nitric oxide synthase) y *óxido nítrico sintasa endotelial* (eNOS, de sus siglas en inglés endothelial nitric oxide synthase) (Tabla 9)¹³⁵, siendo esta última la encargada de amortiguar las alteraciones en el flujo y la presión sanguínea¹³⁶.

Isoforma	Función	Tipo celular
NOS-1 = nNOS	regulación comunicación neuronal	Célula neuronal
NOS-2 = iNOS	regulación respuesta inmune	Célula inmunitaria
NOS-3 = eNOS	regulación tono vascular	Célula endotelial

Tabla 9. Clasificación de las isoformas de la NOS de acuerdo con su ubicación y función (Adaptado de *Kikuchi y colaboradores, 2018*⁶⁸).

3.5.2. Fisiopatología.

La CVD es el nombre bajo el que se agrupa al conjunto de patologías que manifiestan alteraciones cardiovasculares: enfermedad arterial coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad arterial periférica¹³⁷. La principal causa de muerte entre los pacientes diabéticos y con hipertensión es la CVD, lo que la convierte en una de las complicaciones diabéticas de mayor relevancia, presentando un mayor número de factores de riesgo las mujeres diabéticas¹³⁸. La hipertensión ha demostrado estar estrechamente relacionada con un peor pronóstico en el desarrollo de la CVD, y se caracteriza por un aumento en los valores de la *presión arterial sistémica sistólica* (sSAP, de sus siglas en inglés systolic systemic arterial pressure), de la *presión arterial sistémica diastólica* (dSAP, de sus siglas en inglés diastolic systemic arterial pressure), y por consiguiente, de la *presión arterial sistémica media* (mSAP, de sus siglas en inglés mean systemic arterial pressure)¹³⁶.

Uno de los desencadenantes de la CVD es la rigidez arterial, la cual se define como el proceso por el cual las arterias engrosan la morfología de sus tres capas, alterando así su funcionalidad y pudiendo llegar a alcanzarse la disfunción endotelial. La T2D se caracteriza por una elevada resistencia a la insulina, hormona clave en la señalización y síntesis del NO, lo que provoca que pacientes afectados por esta patología manifiesten una alteración en la ruta de producción del NO, lo que va acompañado de un incremento de la rigidez arterial¹³⁹. Por otro lado, la patología diabética cursa con ambientes celulares prooxidantes, los cuales se caracterizan por elevadas concentraciones de los ROS, que son capaces de suprimir la síntesis del NO¹⁴⁰.

3.6. Diabetes y polifenoles.

Son muchos los estudios que en las últimas décadas ponen de manifiesto el papel beneficioso de los polifenoles en numerosas patologías, entre las que se encuentra la diabetes^{3,12,17,25,56}. La diabetes se caracteriza por una hiperglucemia recurrente y, por tanto, por una glicosilación de numerosas moléculas, entre las que se encuentra la hemoglobina; de hecho, los valores elevados de su forma glicosilada en circulación sanguínea se consideran un marcador de la enfermedad. En este sentido, estudios en humanos han puesto de manifiesto que el consumo diario de alimentos ricos en antocianidinas atenúan el riesgo de padecer T2D mediante una reducción de los niveles de HbA1c circulantes³. El contacto constante de los tejidos con las elevadas concentraciones de glucosa va a generar un estado de glucotoxicidad en estos, que se acompaña de un estrés oxidativo constante, lo que hace que gran parte del efecto protector de los polifenoles venga dado por la modulación de esta vía. Así, la apigenina, que es una flavona, es capaz de regular esta ruta de señalización y promover la síntesis de enzimas antioxidantes, como la CAT o la SOD, mediante la activación del Nrf2¹². Además, este ambiente prooxidante presente en la T2D favorece el inicio de la respuesta inflamatoria. Por tanto, polifenoles como el resveratrol, capaces de reducir los niveles del TNF- α y del MCP-1, son considerados beneficiosos en esta patología²⁵. Así mismo, los pacientes con T2D manifiestan una cierta disbiosis que puede ser atenuada por el consumo de ciertos polifenoles⁶².

La DN es una de las principales complicaciones microvasculares en la T2D, y viene acompañada de alteraciones morfológicas, así como de ambientes intracelulares prooxidantes y proinflamatorios. Debido a esto, los polifenoles se postulan como candidatos idóneos para proteger de esta complicación. De manera más concreta, se ha demostrado que el ácido clorogénico es capaz de reducir la hipertrofia renal, la expansión mesangial y activar la ruta de señalización del Nrf2²³. Además, se ha de tener en cuenta que entre los factores que caracterizan a la CVD se encuentran la rigidez arterial y la alteración en la secreción del NO, y ambos procesos se ven sutilmente mejorados cuando los pacientes incorporan en su dieta chocolate negro¹⁶.

4. Microbiota intestinal.

La microbiota intestinal se corresponde con el conjunto de microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal y que coexisten con un hospedador, alcanzando cifras de 1×10^{14} bacterias/gramo de colon, llegando a ser considerada el órgano olvidado humano^{56,58,60}.

4.1. Composición y funciones.

La microbiota intestinal humana se compone principalmente de los filos *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verrucomicrobia*; cada uno de los cuales se subdivide a su vez en géneros, destacando por encima del resto *Ruminococcus* (perteneciente al filo *Firmicutes*), *Bacteroides* y *Prevotella* (ambos pertenecientes al filo *Bacteroidetes*)⁶². La colonización del tracto gastrointestinal por parte de las bacterias comienza con el nacimiento, ya que parte de las bacterias que componen el útero y la placenta materna van a ser las primeras colonizadoras de la microbiota intestinal del recién nacido. A continuación, durante los tres primeros años de vida, se va a producir la evolución y desarrollo de la futura microbiota intestinal, estando influenciada por numerosos factores (forma de nacimiento, infecciones, alimentación y contexto geográfico)⁶¹. Puesto que estas bacterias hospedan una zona clave del organismo, van a llevar a cabo funciones importantes, como son: el desarrollo y maduración del sistema inmune intestinal, el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal y la participación en múltiples funciones metabólicas⁶¹.

4.1.1. Modulación de la respuesta inmune.

La microbiota intestinal juega un papel fundamental en el desarrollo del sistema inmune intestinal, tanto es así, que el proceso de formación de las células del sistema inmune en la médula ósea está parcialmente regulado por ella¹⁴¹. Este sistema inmune está constituido por tres estructuras linfoides: el epitelio intestinal (tapizado en su parte superior por la mucosa intestinal), la lámina propia y las placas de Peyer¹⁴².

La mucosa intestinal es la primera línea de defensa y está compuesta por mucina, un compuesto glucoprotéico con función lubricante y protectora, la cual se va a ver incrementada gracias a la fermentación de los carbohidratos por parte de la microbiota intestinal. A continuación, se sitúa el epitelio intestinal, un tejido monoestratificado que está compuesto por una sola capa de células, entre las que se encuentran las células de Goblet, las células de Paneth y los enterocitos. Las primeras van a ser las encargadas de secretar mucina; las células de Paneth, por su lado, tienen como función la síntesis de péptidos antimicrobianos para mantener el control de la patogénesis, dicha síntesis requiere de una microbiota intestinal concreta para poderse llevar a cabo. Los enterocitos son células de tipo epitelial y constituyen la segunda línea de defensa de la inmunidad intestinal, por ello van a ser los encargados de la señalización extracelular mediante la secreción de citoquinas y quimioquinas hacia el lumen intestinal¹⁴².

La lámina propia se sitúa inmediatamente debajo del epitelio intestinal y se caracteriza por albergar a los linfocitos T y a los linfocitos B, dos tipos celulares claves en el desarrollo de la respuesta inmune. El microbioma va a ser decisivo en este proceso, ya que va a promover la diferenciación de los linfocitos T hacia su fenotipo colaborador, es decir, hacia linfocitos T cooperadores. Por su lado, las placas de Peyer son las encargadas de la producción de los linfocitos B, y por tanto, las responsables de posibilitar la liberación de inmunoglobulinas, proceso que se ve alterado cuando la microbiota intestinal se modifica¹⁴².

Como se ha comentado anteriormente, el correcto funcionamiento del sistema inmune requiere de una microbiota intestinal concreta. Esto se debe a que en la superficie de las bacterias Gram negativas se encuentra una molécula señalizadora denominada *lipopolisacárido* (LPS, de sus siglas en inglés lipopolysaccharide), la cual modula rutas de señalización intracelular en el epitelio intestinal, así como en otros tejidos⁵⁸. Unas de las células más importantes para el desarrollo de la respuesta del sistema inmune son los macrófagos, en cuya membrana se encuentran receptores específicos de unión a los LPS, este es el caso del *receptor tipo toll 4* (TLR4, de sus siglas en inglés toll like receptor 4), que mediante su interacción con la molécula del LPS son capaces de iniciar una cascada de señalización intracelular que desemboca en la activación del NF- κ B¹⁴³.

4.1.2. Regulación de la permeabilidad intestinal.

El epitelio intestinal está formado por distintos tipos celulares; sin embargo, al estar constituido por una única capa de células requiere de uniones intercelulares específicas que aseguren la integridad y la impermeabilidad del epitelio. Estas uniones pueden ser de cuatro tipos: uniones adherentes, uniones estrechas, uniones GAP y desmosomas; siendo las dos primeras las más abundantes. Tanto las uniones adherentes como las estrechas se caracterizan por estar compuestas de anillos contráctiles de actina y miosina, así como de proteínas transmembrana, lo que hace de ellas las responsables de regular la permeabilidad intestinal, modulando el paso de iones, agua y células entre el lumen intestinal y el torrente circulatorio. Una de las proteínas de membrana más estudiadas es la *zónula occludens 1* (ZO-1, de sus siglas en inglés zonula occludens 1), que forma parte de las uniones estrechas y cuyos niveles muestran alteraciones, por ejemplo, cuando la microbiota intestinal varía¹⁴⁴.

4.1.3. Metabolización de los nutrientes.

Toda la comida que se ingiere debe ser digerida y metabolizada por distintos mecanismos, sin embargo, parte de ese alimento no puede ser digerido en las partes iniciales del tracto gastrointestinal, lo que hace que la microbiota intestinal metabolice ciertos compuestos. Este es el caso de la fibra, que sufre el proceso de fermentación por parte de la microbiota intestinal, lo que desencadena la generación de metabolitos beneficiosos para el ser humano como los *ácidos grasos de cadena corta* (SCFAs, de sus siglas en inglés short chain fatty acids). Para este metabolismo, la microbiota intestinal se va a ver ayudada de enzimas específicas, denominadas enzimas activas de carbohidratos, las cuales van a generar concentraciones de SCFAs del orden de 50mM-150mM, absorbiéndose un 95% de ellos en el epitelio intestinal colónico⁵⁵. Las fermentaciones realizadas por las distintas especies de bacterias van a dar lugar a los distintos tipos de SCFAs, lo que provoca que variaciones en la composición de la dieta puedan desembocar en alteraciones de la microbiota intestinal, y por tanto, en el perfil de los SCFAs³⁹.

4.2. Ácidos grasos de cadena corta.

4.2.1. Estructura y función.

El metabolismo anaerobio de la microbiota intestinal da lugar a la liberación de SCFAs, moléculas de ácidos grasos con un número de carbonos inferior a seis. Según este número, los SCFAs principalmente generados son: el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido butírico (dos, tres y cuatro carbonos respectivamente), siguiendo una proporción de 3:1:1 (Tabla 10)¹⁴⁵. Una vez los SCFAs han sido sintetizados, el siguiente paso es la absorción, que puede llevarse a cabo en dos zonas intestinales: en la zona del colon ascendente y en la zona del colon descendente, pero en ambos casos alcanzarán el hígado a través de la vena porta¹⁴⁵.

El **ácido acético** es el metabolito mayoritario procedente de la fermentación de la fibra, no es absorbido por el hígado, lo que hace que pueda llegar a los tejidos periféricos y realizar funciones como la activación de la ruta de la *proteína quinasa activada por adenosina monofosfato* (AMPK, de sus siglas en inglés adenosine monophosphate activated protein kinase) en el músculo y la activación de la síntesis de neuropéptidos anorexigénicos en el hipotálamo¹⁴⁶.

El **ácido propiónico** presenta una función metabólica importante, ya que elevadas concentraciones de este SCFA aumentan la gluconeogénesis en el hígado, así como la funcionalidad de las células β en el páncreas. Por otro lado, es considerado un regulador de la expresión génica, ya que inhibe a las

histonas desacetilasas, modulando así la compactación del material genético¹⁴⁷.

El **ácido butírico** es el metabolito energético por excelencia para las células colónicas y un potente agente antiinflamatorio debido a su capacidad de suprimir la vía de señalización del NF-κB. Se le atribuye también un papel modulador de la permeabilidad intestinal, ya que puede activar la síntesis de mucina y modificar las uniones intercelulares¹⁴⁸.

SCFA	Sustrato	Filo bacteriano productor
Ácido acético	Ácido pirúvico	<i>Proteobacteria</i>
Ácido propiónico	Ácido succínico	<i>Bacteroidetes</i>
	Ácido láctico	<i>Firmicutes</i>
Ácido butírico	Acetil-CoA	<i>Firmicutes</i>

Tabla 10. Clasificación de los principales SCFAs según su sustrato de origen y bacteria fermentadora (Adaptado de Sun y colaboradores, 2017¹⁴⁵).

4.2.2. Receptores de ácidos grasos libres.

Los receptores de ácidos grasos libres son receptores acoplados a proteínas G, lo que significa que cuando se produce la unión del ligando con el receptor, la proteína G anclada en la zona citoplasmática va a activar una cascada de señalización. Sin embargo, no todos los ácidos grasos van a poder actuar como ligandos de estos receptores, ya que tienen mayor afinidad por determinados SCFAs; de manera más concreta, el *receptor de los ácidos grasos libres 2* (FFAR2, de sus siglas en inglés free fatty acid receptor 2) presenta una mayor afinidad por el acetato y el propionato, siendo el *receptor de los ácidos grasos libres 3* (FFAR3) el más afín por el propionato y butirato¹⁴⁹. En lo que se refiere a su expresión, ambos receptores se localizan preferentemente en las células inmunitarias y endocrinas, encontrándose el FFAR2 más presente en los monocitos y adipocitos, a diferencia del FFAR3, expresado de manera más abundante en las células dendríticas y neuronas. Sin embargo, existen tipos celulares en los que se expresan ambos tipos de receptores de manera equitativa, como son las células α y β pancreáticas¹⁵⁰.

4.3. Disbiosis.

La disbiosis se define como la modificación en la composición y la funcionalidad de la microbiota intestinal provocada por factores ambientales y relacionados con el huésped que alteran el ecosistema microbiano. En función del tipo de variación que se produzca entre los componentes de la microbiota intestinal se distinguen tres tipos de disbiosis: por sobrecrecimiento de patobiontes, por pérdida de bacterias residentes y por pérdida de diversidad. En un estado de ausencia de enfermedad, la presencia de bacterias patológicas (patobiontes) en la microbiota intestinal está notablemente reducida, sin embargo, el aumento de estas generaría una disbiosis, y por tanto, una patología. Además, se ha de considerar que el aumento del número de bacterias patológicas lleva asociado la reducción del número de bacterias residentes y, con ello, una variación de la funcionalidad del ecosistema microbiano. Por último estaría la diversidad de la población microbiana; durante los primeros años de vida se produce el desarrollo de esta, pero cambios en la alimentación pueden provocar modificaciones en la diversidad, y con ella, disbiosis en la edad adulta¹⁵¹. Sin embargo, los factores que originan las alteraciones del ecosistema microbiano son variados, destacando tres de ellos: las infecciones, la dieta y el material genético. El estado inflamatorio generado por la entrada al organismo de patógenos va a alterar la composición y el correcto funcionamiento de la microbiota intestinal, similar a lo que ocurre cuando se ingieren dietas bajas en fibra o altas en grasas. La microbiota intestinal juega un papel fundamental en el sistema inmune y en el metabolismo, estando ambos procesos muy influenciados por la carga genética, lo que provoca que alteraciones en ciertos genes vayan acompañadas de modificaciones en el ecosistema microbiano¹⁵¹.

4.3.1. Patologías metabólicas.

Debido a que la microbiota intestinal participa en funciones tan importantes como la modulación del sistema inmune o la metabolización de ciertos nutrientes, la disbiosis parece ser un factor desencadenante de diversas patologías. Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* constituyen más del 90% del total de la microbiota intestinal, por lo que variaciones en la relación de ambos filos se asocia con problemas metabólicos. Este es el caso de la obesidad, patología en la cual el número de especies pertenecientes al filo *Firmicutes* está aumentado, lo que coincide con un aumento en los niveles circulantes de ácido butírico y, por ello, existe un exceso calórico en estos pacientes^{57,58}.

Por otro lado, el estudio del ecosistema microbiano en pacientes afectados de T2D muestra que las variaciones en ciertas especies bacterianas se acompañan de alteraciones en las uniones intercelulares y en los niveles de

los LPS circulantes, alterando la permeabilidad intestinal e incrementando el estado inflamatorio respectivamente^{56,152}. Estos ambientes proinflamatorios favorecen también el desarrollo de las complicaciones diabéticas, como es el caso de la CVD, donde la inestabilidad de las placas ateroscleróticas se ve aumentada por esta situación y, con ello, aumenta el riesgo de padecer la enfermedad⁵⁸. Otra de las complicaciones diabéticas es la enfermedad renal, altamente afectada por la hipertensión, cuyo riesgo aumenta cuando se producen modificaciones en los niveles circulantes de los SCFAs, que alteran la regulación de FFAR3⁵⁹.

4.3.2. Disbiosis y polifenoles.

Algunos compuestos fenólicos no son absorbidos en el intestino y llegan hasta el colon, donde interaccionan directamente con la microbiota intestinal; este hecho hace que los compuestos fenólicos sean considerados importantes moduladores del ecosistema microbiano y, por tanto, de la disbiosis⁶². Este es el caso de la obesidad, donde la ingesta de té verde reduce el ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* alterado por una dieta alta en grasa¹⁵³. Además, se ha demostrado que el tratamiento durante ocho semanas con el aceite de té es efectivo en la reducción de los valores de hiperglucemia en la T2D, lo que se ha asociado con el incremento de las bacterias pertenecientes a la familia *Lachnospiraceae*¹⁵⁴. De manera similar, polifenoles como el resveratrol y la quercetina han demostrado aumentar las especies bacterianas del filo *Bacteroidetes*, provocando un efecto cardioprotector en la CVD¹⁵⁵. Los SCFAs son el resultado del metabolismo fermentativo de la fibra por la microbiota intestinal, lo que conlleva que dietas ricas en fibras eleven los niveles de *Bacteroides acidifaciens* y, con ello, atenúen los marcadores de disfunción renal¹⁵⁶.

5. Cacao.

El cacao es un alimento procedente del fruto de un árbol denominado *Theobroma cacao*, comúnmente conocido como cacaotero, que tras una serie de procesos químicos acaba dando lugar al producto definitivo¹⁵⁷. Se distinguen tres variedades del cacaotero y, con ello, de cacao: *Theobroma cacao* Criollo, *Theobroma cacao* Trinitario y *Theobroma cacao* Forastero; siendo este último el que supone el 95% de la producción mundial de cacao¹⁵⁸.

Introducción

5.1. Composición.

El cacao es un alimento con un elevado contenido en fitoquímicos, ya que entre sus constituyentes se encuentra la fibra, los flavanoles (catequina, EC, procianidinas) y las metilxantinas (teobromina). Sin embargo, el procesamiento químico que sufren las semillas de cacao conlleva una pérdida de gran parte de sus componentes, y por tanto, de sus propiedades¹⁵⁷. En primer lugar, las semillas del cacao van a sufrir el proceso de fermentación, que marcará las propiedades organolépticas del producto final, seguido del proceso de secado para reducir la humedad a un 7%. A continuación, las habas del cacao van a ser tostadas a altas temperaturas, procedimiento clave en el procesado, ya que es el paso en el que se pierden la mayor parte de los polifenoles¹⁵⁹.

5.2. Actividad biológica.

El cacao es rico en compuestos fenólicos, y presenta propiedades derivadas de ellos, lo que hace de él un alimento con elevado valor biológico.

5.2.1. Actividad antioxidante.

Son muchos los factores que pueden hacer que aumenten los ROS en la célula, si esto no se compensa por la acción de las defensas antioxidantes, la situación puede desencadenar un estrés oxidativo celular⁶³. A modo de ejemplo, el deporte de élite es uno de estos factores, ya que al realizarse de manera intensa y continuada hace que el tejido muscular se vea sometido a un incremento de estrés oxidativo y de daño muscular. No obstante, estudios en deportistas de élite ponen de manifiesto que el consumo de chocolate negro con un porcentaje de cacao por encima del 85% proporciona efectos beneficiosos, ya que es capaz de incrementar la relación GSH/GSSG, así como de reducir los niveles del MDA, lo que se relaciona con una disminución del estrés oxidativo^{160,161}.

5.2.2. Actividad antidiabética.

La sintomatología de los pacientes afectados de T2D muestra un defecto en la secreción de la insulina, así como una resistencia a esta por parte de los tejidos periféricos, que conduce a una hiperglucemia en estos pacientes^{50,111}. El cacao se postula como alimento beneficioso para estos pacientes, ya que diversas aproximaciones científicas demuestran que la ingesta de cacao mejora la funcionalidad de las células β pancreáticas, reduce la resistencia a la insulina y los niveles circulantes de HbA1c^{3,16,162}.

5.2.3. Actividad antiobesogénica.

Las personas que padecen obesidad se caracterizan por tener una ingesta continua de calorías, que asociada a una falta de efecto saciante, acaba provocando un acúmulo de lípidos en los tejidos y en el torrente circulatorio, generando lipotoxicidad e inflamación⁵¹. Una de las principales propiedades del cacao es su carácter astringente y saciante, lo cual se demuestra en diversos estudios científicos en los que el tratamiento de personas obesas con este producto reduce la sensación de apetito y la ingesta de comida, provocando un descenso del índice de masa corporal⁴. Por otro lado, cuando se estudia el perfil lipídico de estos pacientes, se puede observar que aquellos que son sometidos a un tratamiento continuo con chocolate negro presentan una reducción en los niveles del LDL, colesterol y triglicéridos¹⁶³.

5.2.4. Actividad antiinflamatoria.

La inflamación crónica es considerada una de las principales causas en el desarrollo de las enfermedades metabólicas de mayor incidencia entre la población mundial, como son la diabetes o la obesidad⁵². En la respuesta inflamatoria se produce la liberación de citoquinas proinflamatorias, sustentada por la activación de la ruta de señalización del NF- κ B, si bien los efectos antiinflamatorios del cacao parecen estar relacionados con la capacidad de este para aumentar los niveles de expresión del TGF- β y para inactivar la ruta anteriormente comentada^{164,165}.

5.2.5. Actividad cardioprotectora.

Bajo el nombre de CVD se engloban todos aquellos desórdenes vasculares que implican alteraciones en el sistema circulatorio y el corazón provocados por múltiples factores. Se distinguen dos agentes causantes de esta: los factores invariables, entre los que destacan la edad y el sexo, y los variables, que engloban al estilo de vida, así como a patologías como la T2D o la obesidad⁵³. El consumo diario de cacao ha demostrado tener efectos beneficiosos en el ámbito vascular, ya que es capaz de reducir la presión sanguínea y mejorar la función vascular, lo que provoca una mejora de la salud cardiovascular en individuos sanos, así como en pacientes con CVD o con riesgo de padecerla¹⁶⁶.

5.2.6. Actividad anticancerígena.

El estrés oxidativo es capaz de alterar los nucleótidos del ADN, provocando oxidaciones en sus bases nitrogenadas y, con ello, mutaciones. El acúmulo de estas en genes supresores de tumores, entre otros aspectos, puede dar lugar al inicio del proceso tumoral, así como al desarrollo de un entorno prooxidante que provoca inestabilidad genética y, con ello, un incremento del riesgo de padecer metástasis⁷⁹. Debido a su actividad antioxidante, la ingesta diaria de cacao ha demostrado disminuir el daño del material genético, dando indicios de que podría estar relacionado con una disminución del riesgo de padecer cáncer¹⁶⁷.

5.2.7. Actividad moduladora de la microbiota intestinal.

Las bacterias que hospedan nuestro intestino ejercen múltiples funciones, lo que hace que el equilibrio de estas sea necesario para el correcto funcionamiento del organismo. Todo ello, junto a la localización que ocupan en el individuo, hace que la alimentación guarde una estrecha relación con la modificación de la microbiota intestinal⁵⁵. Una de estas funciones es la de modular la respuesta del sistema inmune. Se ha visto que el consumo de cacao en individuos sanos es capaz de aumentar algunos géneros bacterianos (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus*), desencadenando un aumento de la liberación de citoquinas antiinflamatorias, atribuyendo al cacao un papel prebiótico¹⁶⁴.

5.2.8. Otras actividades.

Diversos estudios han puesto de manifiesto que la ingesta de cacao en cantidades controladas reduce el riesgo de padecer otras enfermedades además de las patologías comentadas anteriormente. En el caso de la salud cerebral, el consumo regular de cacao ha demostrado reducir el riesgo de enfermedades neurodegenerativas por mejorar las capacidades cognitivas y prevenir del deterioro de la memoria asociado al envejecimiento¹⁶⁸. El daño renal se ha considerado una complicación diabética microvascular, si bien una dieta rica en cacao ha demostrado tener efectos protectores en pacientes sometidos a hemodiálisis¹⁶⁹.

La T2D es un desorden metabólico complejo considerado como uno de los principales problemas de salud mundial debido a su alta prevalencia y sus complicaciones asociadas. Entre estas últimas se pueden destacar el fallo renal y la enfermedad vascular, objeto de estudio de la presente tesis doctoral. En la actualidad, y a pesar de la gran selección de agentes farmacológicos hipoglucemiantes, la eficacia de los mismos en la protección frente al desarrollo de las complicaciones diabéticas, responsables de más del 70% de las muertes de estos pacientes, ha mostrado ser muy limitada. Así pues, existe una necesidad urgente de buscar nuevos agentes que contribuyan a continuar avanzando en la prevención y control de esta patología. En este sentido, una alternativa prometedora y de bajo coste es la actuación nutricional. Así, entre los componentes de los alimentos que han despertado un gran interés en los últimos años por su potencial efecto beneficioso en salud y seguridad destacan los polifenoles, que entre sus actividades han demostrado tener efectos antidiabéticos. Sin embargo, apenas se conocen los posibles mecanismos moleculares de acción por los que estos fitoquímicos parecen ejercer un efecto favorable sobre las complicaciones diabéticas asociadas a la T2D.

Diversos estudios han mostrado que la modulación de numerosas vías de transducción de señales y del estrés oxidativo parecen tener un papel relevante en la aparición de las complicaciones diabéticas micro- y macro-vasculares, como son las complicaciones renales y endoteliales (enfermedades cardíacas). En este sentido, los polifenoles de la dieta, y más concretamente un grupo que está presente de manera abundante en el cacao, los flavanoles, podrían ser excelentes protectores frente a las alteraciones reseñadas, lo que les hace firmes candidatos como agentes preventivos frente al desarrollo de patologías como la T2D y sus complicaciones.

Por todo ello se han planteado los siguientes objetivos:

1. Estudiar el efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo renal en modelos celulares y en animales diabéticos.
2. Estudiar el efecto de los flavanoles del cacao sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo vascular en modelos celulares y en animales diabéticos.
3. Estudiar el efecto de los flavanoles del cacao sobre la salud intestinal y la microbiota intestinal en animales diabéticos.
4. Estudiar el efecto antiinflamatorio de los flavanoles del cacao en modelos celulares y en animales diabéticos.

1. Reactivos.

La (-)-EC (> 95% de pureza), el DHBA (99% de pureza), el HPPA (> 98% pureza), el DHPAA (> 98% de pureza), el VA (> 97% de pureza), el [Clorhidrato de 2-(4-morfolinil)-8-fenil-1(4H)-benzopiran-4-ona] (LY294002), el difeniloiodonio (DPI), el 6-cloro-2,3,4,9-tetrahidro-1H-carbazol-1-carboxamida (EX-527), la GR, el GSH, el GSSG, el NADPH, la florizina, el anticuerpo IgG-agarosa anti-ratón, el *o*-ftalaldehído (OPT), la gentamicina, la penicilina G, la estreptomycin, la albúmina de suero bovino (fracción V), el 6-[4-(2-piperidin-1-iletoxi) fenil]-3-piridin-4-ilpirazolo [1,5-a] pirimidina (Compuesto C), el *tert*-butil hidroperóxido (*t*-BOOH), la proteinasa K, el H₂O₂, el 3,3'-diaminobenzidina (DAB), el L-lactato de sodio, el kit de actividad de la SOD y el kit de análisis de la glucosa se adquirieron en Sigma Aldrich (Madrid, España).

La D-glucosa y la sonda fluorescente 2-deoxi-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-il) amino] (2-NBDG) se compraron en Molecular Probes (Invitrogen, Madrid, España). Las sondas fluorescentes 2',7'-diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA), 4-amino-5-metilamino-2,7-difluorofluoresceína diacetato (DAF-FM-DA) y Calceína AM fueron de Molecular Probes (Eugene, Oregón, Estados Unidos).

Los anticuerpos primarios anti-AKT, anti-fosfo-Ser473-AKT, anti-GSK3 α/β , anti-fosfo-Ser21/9-GSK3 α/β , anti-GS, anti-fosfo-Ser641-GS anti-AMPK, anti-fosfo-Thr172-AMPK, anti-fosfo-Ser1177-eNOS, anti-ERK1/2, anti-fosfo-Thr202/Thy204-ERK1/2, anti-JNK1/2, anti-fosfo-Thr180/Tyr182-p38 α , anti-cleaved-caspase-3, anti-cleaved-caspase-9, anti-fosfo-Ser2448-mTOR, anti-CD45, anti-ciclinaE, anti-p21 y anti- β -actina se obtuvieron de Cell Signaling Technology (Izasa, Madrid, España). Los anticuerpos primarios anti-IR β , anti-fosfo-Tyr1150/1151-IR β , anti-SGLT-2, anti-PEPCK, anti-fosfo-Tyr20, anti-G-6-Pasa, anti-eNOS, anti-fosfo-Ser63/73-JNK1/2, anti-p38 α , anti-NOX-4, anti-SIRT-1, anti-Bcl-x, anti-Bax, anti-p62, anti-beclina-1, anti-LC3, anti-ZO-1, anti-TNF- α , anti-IL-6, anti-MCP-1, anti-NOS2, anti-COX-2, anti-VCAM-1, anti-ICAM-1, anti-CD68, anti-p65-NF- κ B, anti-fosfo-Ser536-p65-NF- κ B, anti-metalonioneina y anti- α -actinina se compraron en Santa Cruz (Qimigen, Madrid, España). El anticuerpo primario anti-fosfo-Ser40-Nrf2 se obtuvo de Signalway Antibody (Qimigen, Madrid, España). El anticuerpo primario anti-mTOR se adquirió en Upstate (Isaza, Madrid, España). El anticuerpo primario anti-PCNA Ab-1 fue adquirido en Lab Vision Corporation (Bionova Científica S.L., Madrid, España). Los anticuerpos primarios anti-IRS-1 y anti-GLUT-2 fueron de Millipore (Madrid, España). El anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peróxido y el reactivo de detección de quimioluminiscencia ECL se obtuvieron en GE Healthcare (Madrid, España). El anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con peróxido se compró en Sigma Aldrich (Madrid, España).

Material y métodos

Los kits de detección de HbA1c y albúmina se compraron en Spinreact (BioAnalítica, Madrid, España). El kit ELISA para la cuantificación de la insulina de rata se adquirió en Mercodia (AD Bioinstruments, Barcelona, España), los kits de la creatinina y ácido úrico se obtuvieron en Linear Chemicals S.L. (Barcelona, España), y el kit del análisis fluorométrico de glucógeno fue de BioVision (Deltaclon, Madrid, España).

La transferasa terminal recombinante se obtuvo en Roche Applied Science (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Alemania). El reactivo de Bradford y los materiales y productos químicos para la electroforesis se adquirieron en BioRad (BioRad Laboratories S.A., Madrid, España). El reactivo PicoGreen Quant-IT se compró en Thermo Fisher Scientific Inc. (Madrid, España). La L-glutamina fue de Cultek (Cajal, Madrid, España). El medio de cultivo celular y el suero fetal bovino se obtuvieron en Lonza (Madrid, España).

2. Modelos experimentales.

2.1. Cultivos celulares.

2.1.1. Células NRK-52E.

Las células NRK-52E utilizadas (cortesía del Prof. Dr. Patricio Aller, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España) pertenecen a la especie de rata *Rattus norvegicus*, se extrajeron del túbulo contorneado proximal renal y se cultivaron en medio DMEM (glucosa 5,5 mM; glutamina 2 mM y suero fetal bovino 10%). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y un 95% de aire. Para evaluar el efecto directo de los ácidos fenólicos las células se trataron durante 24 horas con diferentes concentraciones de la EC, del DHBA, del HPPA, del DHPAA o del VA (1–20 µM), diluidas en medio DMEM sin suero (glucosa 5,5 mM; glutamina 2 mM). Para estudiar el efecto protector de estos compuestos frente a las condiciones de glucotoxicidad, las células se preincubaron con diferentes concentraciones de la EC, del DHBA, del HPPA o del DHPAA (1–20 µM) durante 2 horas antes del tratamiento con la glucosa (30 mM, 22 horas). Para evaluar el efecto protector de estos compuestos frente a la inflamación, las células se preincubaron con diferentes concentraciones de la EC, del DHBA, del HPPA o del DHPAA (1–10 µM) durante 2 horas. A continuación, se incubaron con una dosis alta de glucosa (30mM) y diferentes concentraciones del LPS (0-5 µg/mL) durante 22 horas. En los experimentos con los inhibidores, las células se preincubaron con la Florizina 0,5 mM (inhibidor del SGLT-2), el DPI 10 µM (inhibidor de la NOX), el EX-527 10 µM (inhibidor de la SIRT-1), el Compuesto C 10 µM (inhibidor de la AMPK) o el LY294002 20 µM (inhibidor de la AKT) durante 1 hora antes del tratamiento con la EC, el DHBA o el DHPAA durante 2 horas, para, a continuación, incubarlas con la glucosa (22 horas).

2.1.2. Células EA.hy926.

Los experimentos se realizaron utilizando la línea celular endotelial humana EA.hy926 (cortesía del Prof. Dr. Patricio Aller y Carmelo Bernabéu, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España), derivada de un hibridoma de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano y la línea celular humana permanente A549. Las células se mantuvieron en un incubador humidificado que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire a 37 °C, además, se cultivaron en medio DMEM (glucosa 25 mM; glutamina 6,2 mM y suero fetal bovino 10%), complementado con 1% de los siguientes antibióticos: gentamicina, penicilina y estreptomicina. Las diferentes concentraciones del DHBA, del HPPA o del DHPAA (1–10 µM) se diluyeron en medio de cultivo DMEM sin suero (glucosa 25 mM; glutamina 6,2 mM) y se añadieron a las placas celulares durante 18 horas. Una mezcla de los ácidos fenólicos (MIX) 12 µM (4 µM del DHBA + 4 µM del HPPA + 4 µM del DHPAA) también se agregó al medio de cultivo para probar el potencial aditivo y sinérgico de los metabolitos. Para evaluar el efecto protector de los ácidos fenólicos frente a un estrés oxidativo, las células fueron preincubadas con diferentes concentraciones del DHBA, del HPPA o del DHPAA (1–10 µM) y con el MIX (12 µM) durante 6 horas antes de la estimulación con el *t*-BOOH. A continuación, se incubaron con diferentes dosis del *t*-BOOH (25–100 µM) durante 18 horas, con las mismas concentraciones de compuestos adicionadas previamente. Para estudiar el efecto protector de los ácidos fenólicos frente a una situación inflamatoria, las células fueron preincubadas con el DHBA, el HPPA o el DHPAA (10 µM) y con el MIX (12 µM) durante 6 horas antes de la estimulación con el TNF-α. A continuación, se incubaron con diferentes dosis del TNF-α (50–500 ng) durante 18 horas, con las mismas concentraciones de compuestos adicionadas previamente. En los experimentos con los inhibidores, las células se preincubaron con el LY294002 10 µM (inhibidor de la AKT) o con el Compuesto C 5 µM (inhibidor de la AMPK) durante 1 hora antes del tratamiento con el DHBA, el HPPA, el DHPAA y el MIX (18 horas).

2.1.3. Células THP-1.

Los ensayos de adhesión de monocitos a las células EA.hy926 se realizaron utilizando la línea celular de monocitos humanos THP-1 (cortesía del Prof. Dr. Patricio Aller y Carmelo Bernabéu, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, España), derivada de una leucemia aguda humana.

Las células se mantuvieron en un incubador humidificado que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire a 37 °C, además, se cultivaron en suspensión en el medio RPMI (glucosa 11,1 mM; glutamina 2 mM y suero fetal bovino 10%), complementado con 1% de los siguientes antibióticos: gentamicina, penicilina y

Material y métodos

estreptomycin. Para el marcaje fluorescente los monocitos se trataron durante 30 minutos con calceína a una concentración final de 7,5 μ M.

2.2. Animales de experimentación.

2.2.1. Rata Zucker Diabética Obesa.

Para los experimentos *in vivo* se utilizó machos del modelo animal de ratas *Zucker diabéticas y obesas* (ZDF, de sus siglas en inglés *zucker diabetic fatty*) [ZDF/crl-lepr (fa/fa), (n= 16) y sus correspondientes controles *Zucker delgados* (ZL, de sus siglas en inglés *Zucker Lean*) (n=6). Los 24 animales se compraron en los Laboratorios Charles River (L'Arbresle, Francia) a las 9 semanas de edad. Las ratas ZDF poseen una mutación en el receptor de leptina y espontáneamente desarrollan obesidad severa, hiperglucemia, hiperlipidemia y resistencia a la insulina, por ello, son ampliamente utilizadas como modelo experimental para el estudio de la T2D. Los animales se colocaron en jaulas en grupos de dos bajo condiciones ambientales controladas (19-23 °C, 50-60% de humedad y 12 h de ciclo luz-oscuridad). Después de una semana de adaptación, las ratas ZDF se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos experimentales: un grupo recibió una dieta estándar (ZDF-C) y el otro grupo se alimentó con una dieta rica en cacao (ZDF-Co). Las ratas ZL permanecieron como un grupo único y se alimentaron con una dieta estándar control. Ambas dietas fueron isocalóricas y todos los animales recibieron comida y agua *ad libitum*. Durante el estudio la ingesta de comida por rata se monitorizó diariamente y el peso de los animales semanalmente. Después de diez semanas, los animales se sometieron a un ayuno nocturno antes del sacrificio. Todos los protocolos utilizados en el modelo de experimentación animal fueron aprobados por los Comités de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid, España) y la Universidad Complutense de Madrid (UCM, Madrid, España) y el Comité regional de animales de laboratorio y Bienestar (Comunidad de Madrid, número de referencia PROEX-304-15). Los animales se trataron de acuerdo con las Instrucciones de Atención Institucional (Comisiones de Bioética del CSIC y UCM).

2.2.2. Dieta rica en cacao.

La dieta rica en cacao que recibió el grupo de ratas ZDF-Co se administró en polvo, y se trata de un cacao de la variedad Forastero (cortesía de Idilia S.L., Barcelona, España). Las dietas se prepararon siguiendo la formulación de AIN-93G (Panlab S.L., Barcelona, España), mediante la cual se les proporcionaba a los animales todos los nutrientes requeridos para las ratas

adultas. La formulación de AIN-93G carece de celulosa, almidón y sacarosa, por lo que para preparar la dieta rica en cacao se añadieron los ingredientes mencionados, ajustando las cantidades de carbohidratos y fibra de acuerdo con la cantidad de cacao agregado. La dieta rica en cacao, que presentaba un 10% de este, se elaboró al agregar 100 g de cacao/Kg de dieta AIN-93G. Esta adición de cacao a la dieta tras ajustar los macronutrientes, como se ha mencionado, hizo que dicha dieta fuera ligeramente más rica en proteínas (2,2%) y en lípidos (1,1%). Sin embargo, con el objetivo de que ambas dietas fueran isoenergéticas, el contenido en carbohidratos se redujo ligeramente (4,2%) en la dieta suplementada con cacao.

3. Preparación de muestras.

3.1. Preparación de extractos proteicos celulares.

Para el estudio de las muestras obtenidas de las líneas celulares se lisaron a 4°C en un tampón que contenía HEPES 25 mM (pH 7,5), NaCl 0,3 M, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 0,2 mM, 1,4-ditiotreitol 0,5 mM, 0,1% de Tritón X-100, β-glicerolfosfato 200 mM, Na₃VO₄ 0,1 mM, leupeptina 2 µg/ml y fluoruro de metilsulfoniolo (PMSF) 1 mM. A continuación, se recogieron los sobrenadantes y se analizó la concentración de proteínas con el reactivo de Bradford, para posteriormente alicuotarse y almacenarse a -80°C hasta su uso.

3.2. Muestras tisulares.

3.2.1. Bioquímica de tejidos y suero.

Para el análisis bioquímico de los riñones y arterias obtenidos de los animales de experimentación los tejidos congelados se homogeneizaron 1:5 (w:v) en un tampón compuesto de HEPES 50 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 1 mM, glicerol 10%, Na₄P₂O₇ 10 mM, NaF 10 mM, EDTA 2 mM, Nonidet P-40 1%, Na₃VO₄ 2 mM, leupeptina 5 µg/ml, aprotinina 20 µg/ml, benzamidina 2 mM y PMSF 2 mM.

Los homogeneizados se centrifugaron a 14000 g durante 60 min y los sobrenadantes fueron recolectados y analizados para determinar la concentración de proteína usando el reactivo de Bradford, para posteriormente alicuotarse y almacenarse a -80°C hasta su uso. Las muestras sanguíneas se obtuvieron del ventrículo derecho de los animales de experimentación. Para el análisis bioquímico de las mismas se centrifugaron a 1000 g, 10 min, 4 °C, con el fin de separar el suero de las células sanguíneas, alicuotándose este último para almacenarse a -80°C hasta su uso.

Material y métodos

3.2.2. Histología de los tejidos.

Para el estudio histológico de los tejidos obtenidos de los animales de experimentación, el riñón izquierdo y el cayado aórtico, se fijaron durante una noche en *p-formaldehído* (PFA) 4% en tampón fosfato 0,1 M (pH 7,4). A continuación, los tejidos se incluyeron en parafina y se cortaron en secciones seriadas de 4 μ m, para posteriormente montarlos en portaobjetos de vidrio.

3.3. Muestras fecales.

Para el análisis metagenómico de las heces se recogieron muestras fecales frescas al final del período de intervención y tras someter a los animales a un ayuno nocturno. Para la obtención de las muestras y mediante masaje abdominal, las heces se recolectaron a primera hora de la mañana en tubos Eppendorf para inmediatamente almacenarse -80°C hasta su uso.

4. Técnicas.

4.1. Técnicas bioquímicas.

4.1.1. Viabilidad por cristal violeta.

La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de cristal violeta. Las células se sembraron a baja densidad (10^4 células por pocillo) en placas de 96 pocillos, y tras someterlas a los tratamientos correspondientes se incubaron con la solución de cristal violeta (0,2% en etanol) durante 20 min. Las placas se lavaron con agua, se dejaron secar y se añadió SDS 1%. La absorbancia de cada placa se midió usando un lector de microplacas a 570 nm.

4.1.2. Producción de las especies reactivas de oxígeno.

Los ROS celulares se cuantificaron mediante el ensayo DCFH utilizando un lector de microplacas. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (1×10^5 células por pocillo) y se incubaron con los diferentes tratamientos. A continuación, se añadió DCFH 10 μ M a los pocillos y las células se incubaron durante 30 minutos a 37°C. El DCFH, una vez ha sido oxidado por los distintos agentes oxidantes celulares, se convierte en diclorofluoresceína (DCF) y emite fluorescencia. Así, se evaluó la generación de los ROS en un lector de microplacas fluorescentes a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, Estados Unidos).

4.1.3. Contenido del glutathion reducido.

El GSH se cuantificó mediante un ensayo fluorimétrico que se basa en la reacción del GSH con el OPT a pH 8.0. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 340 nm y una longitud de onda de emisión de 460 nm. Los resultados se interpolaron a partir de una curva estándar de GSH.

4.1.4. Actividad de enzimas antioxidantes.

La determinación de la actividad GPx se fundamenta en la oxidación del GSH por la GPx, usando t-BOOH como sustrato, acoplada a la desaparición del NADPH por la GR. La actividad de la GR se analizó siguiendo la oxidación del NADPH, que es utilizado en la reducción del GSSG. La actividad de la CAT se determinó por la descomposición del H₂O₂. La actividad de estas tres enzimas se observa como una disminución en la absorbancia a 240 nm. La actividad de la SOD se cuantificó usando un kit comercial (Sigma Madrid, España) cuyo fundamento se basa en la capacidad de la enzima para reducir el O₂⁻; esta reacción está acoplada a la desaparición del tetrazolio, una sal con capacidad de generar un colorante. La actividad de esta enzima se cuantificó como la disminución de la absorbancia a 440 nm.

4.1.5. Contenido de grupos carbonilos.

La oxidación de las proteínas de las células se midió como el contenido de grupos carbonilos presentes en la muestra. Cada muestra, que contenía 500 µg de proteína, se procesó por duplicado. En una de las muestras se añadió 2,4-dinitrofenilhidrazina 0,2% en HCl 2M, y a la otra únicamente el HCl (blanco de referencia). Las proteínas se precipitaron mediante la adición de ácido tricloroacético 20%, y se centrifugaron durante 5 min a 11750 g. Después, los precipitados de las proteínas se lavaron 3 veces con 1 mL de una mezcla de acetato de etilo:etanol (1:1, v:v). A continuación, los precipitados resultantes se dejaron secar al aire y se resuspendieron en guanidina 6M. La absorbancia de cada muestra se midió a 360 nm y se corrigió con su blanco de referencia, para finalmente expresar el contenido de grupos carbonilos como nmoL/mg de proteína, usando un coeficiente de extinción de 22000 nmoL/L/cm.

4.1.6. Producción del óxido nítrico.

La producción del NO por las células endoteliales se midió utilizando la sonda fluorescente DAF-FM, que es un derivado fluorado del DAF-2. La forma del diacetato de DAF-FM (DAF-2-DA) es capaz de atravesar la membrana

Material y métodos

celular y ser metabolizado por las esterasas intracelulares, lo que da lugar al compuesto con carga negativa DAF-2, incapaz de cruzar la membrana celular y, por lo tanto, acumulable dentro de las células. En presencia del NO, el DAF-2 se transforma en un triazol fluorescente (DAF-2T), por lo que la producción del NO se detectó por fluorescencia. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (2×10^5 células por pocillo) y se incubaron con los diferentes tratamientos. A continuación, se añadió DAF-2 $0,1 \mu\text{M}$ durante 30 minutos a 37°C , para finalmente ser lavadas tres veces con PBS. La fluorescencia de las células y los sobrenadantes se evaluó en un lector de microplacas fluorescentes a una longitud de onda de excitación de 495 nm y una longitud de onda de emisión de 515 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, EE. UU.). La fluorescencia obtenida de las células se restó a su valor de sobrenadante sin las células.

El NO intracelular también se visualizó por microscopía de fluorescencia. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se sometieron a los tratamientos deseados. A continuación, se añadió $2,5 \mu\text{M}$ de DAF-2-DA durante 30 minutos a 37°C , se lavaron tres veces con PBS y se visualizaron con un microscopio de fluorescencia invertido Leica AF6000 LX (longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión 515 nm).

4.1.7. Ensayo de producción de glucosa.

Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (2×10^5 células por pocillo) y después del tratamiento, el medio fue reemplazado por un medio de producción de glucosa constituido por un DMEM sin glucosa (pH 7.4) sin rojo fenol (Invitrogen, Madrid, España), suplementado con 5 mM de lactato de sodio y 5 mM de glutamina. Después de 1,5 h de incubación, se recogió el medio y se midió la concentración de glucosa con un kit colorimétrico de análisis de la glucosa (Sigma, Madrid, España). Las lecturas obtenidas se normalizaron con el contenido de proteína total calculado en los lisados celulares.

4.1.8. Ensayo de captación de glucosa.

La captación de glucosa se cuantificó mediante el ensayo de la 2-NBDG utilizando un lector de microplacas. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos (2×10^5 células por pocillo). Después de los tratamientos, se añadió el 2-NBDG a una concentración final de $10 \mu\text{M}$ y se incubó durante 1 h a 37°C . Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS, se añadió medio sin suero y la intensidad de fluorescencia se midió inmediatamente en un lector de microplacas a una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 530 nm. La estimación precisa de la captación global de glucosa se obtuvo cuantificando la disminución en la fluorescencia de dicho

metabolito, ya que tras la captación de la sonda por las células se convierte en un derivado no fluorescente (metabolito 2-NBDG).

4.1.9. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

Para la realización del *ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas* (ELISA, de sus siglas en inglés enzyme-linked immunosorbent assay) en los estudios *in vitro* se han utilizado los sobrenadantes de los cultivos de las células NRK-52 tratadas con altas dosis de glucosa y el LPS, y los cultivos de las células EA.hy926 tratadas con el TNF- α . Por otro lado, para realizar los ensayos de ELISA *in vivo* se han utilizado extractos tisulares (riñón y aorta) u sueros sanguíneos obtenidos de los animales en ayunas. Las muestras de los ensayos se inmovilizaron en un soporte sólido sobre el que se añadieron los anticuerpos primarios anti-TNF- α (en el caso de las células NRK-52E), anti-IL-6 (en el caso de las células EA.hy926) y anti-Insulina (en el caso de los sueros sanguíneos). A continuación, se añadió un anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa. La absorbancia de cada placa se midió usando un lector de microplacas a 570 nm, (Bio-Tek, Winooski, VT, Estados Unidos).

4.1.10. Inmunoprecipitación.

Los extractos proteicos obtenidos como se ha descrito anteriormente (200 μ g de proteína) se inmunoprecipitaron durante una noche a 4°C con rotación suave en presencia de 2-5 μ g del anticuerpo anti-fosfo-Tyr20. A continuación, se añadió el anticuerpo IgG-agarosa anti-ratón, y después de mezclar durante 2 h, se recogieron los precipitados, se lavaron y se guardaron a -80°C para su posterior análisis.

4.1.11. Western blot.

En la técnica del *Western blot* (WB) se utilizaron cantidades iguales de proteínas, las cuales se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Bio-Rad, Madrid, España). Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente seguido de otra incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón conjugado con un peróxido. Las bandas se visualizaron por ECL. La normalización de las bandas se hizo con la β -actina y la α -actinina, y las proteínas se cuantificaron utilizando un escáner y el software.

4.1.12. Test de Tolerancia a la Glucosa.

Para llevar a cabo el *test de tolerancia a la glucosa* (GTT, de sus siglas en inglés glucose tolerance test) los animales de experimentación fueron mantenidos en ayunas durante la noche. A la mañana siguiente, se les administró matinalmente una solución de glucosa al 35% de manera intraperitoneal (2 g/Kg de peso corporal). Las muestras de sangre se obtuvieron de la cola antes de la carga de glucosa ($t = 0$) y a los 15, 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de la misma. Los niveles de glucosa en sangre se midieron con un glucómetro (LifeScan España, Madrid, España) y los cambios de glucemia durante el GTT fueron calculados como el área bajo la curva (AUC) por encima de los niveles basales.

4.1.13. Determinación de parámetros bioquímicos con Kits comerciales.

Para el estudio de los parámetros en suero sanguíneo las muestras de sangre se recogieron de la cavidad ventricular durante el sacrificio para posteriormente obtener el suero mediante centrifugación, como se ha descrito. El colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y los triglicéridos se midieron con kits colorimétricos a distintas longitudes de onda: 500 nm, 546/700 nm, 600/700 y 500 nm respectivamente (BioSystems Atom, Madrid, España). La glucosa en sangre se determinó usando un analizador de glucosa contable (LifeScan España, Madrid, España).

La insulina se evaluó con un kit de ELISA para insulina de rata con un límite de detección inferior a 0,15 ng/mL. La HbA1c se midió usando un kit de turbidimetría de látex siguiendo las instrucciones del fabricante, siendo la cantidad mínima detectable 0,1%. La creatinina se analizó con un kit colorimétrico siguiendo las instrucciones del fabricante. La sensibilidad a la insulina se estimó mediante la determinación del HOMA-IR siguiendo la siguiente fórmula: $[\text{glucosa en ayunas (mM)} \times \text{insulina en ayunas (mUL/L)}] / 22,5$, y mediante el *modelo homeostático de evaluación de la sensibilidad a la insulina* (HOMA-IS, de las siglas en inglés homeostatic model assessment insulin sensitivity) de acuerdo con la siguiente fórmula: $[10000 / (\text{glucosa en ayunas (mg/ dL)} \times \text{insulina en ayunas (ng/mL)})]$. La funcionalidad de las células β se evaluó mediante el *modelo homeostático de evaluación de la funcionalidad beta* (HOMA-B, de las siglas en inglés homeostatic model assessment insulin β) de acuerdo con la siguiente fórmula: $[20 \times [\text{insulina en ayunas (}\mu\text{U/mL)}] / [\text{glucosa en ayunas (mmol/L)} - 3,5]$

Para el estudio de los parámetros en orina las muestras se recogieron tras poner de manera individual durante 23 h a cada animal en jaulas metabólicas. La glucosa y la albúmina urinarias se midieron por el método de la

glucosa oxidasa y un kit de turbidimetría de látex, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. El eGFR (mL/min) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: [(creatinina en orina (mg/dL) x volumen de orina (mL/min)) / suero creatinina (mg/dL)].

Para cuantificar el contenido de glucógeno renal, se tomaron muestras de riñón congelado que se trataron con KOH 30%; a continuación, se hirvieron y centrifugaron a 12000 g durante 5 min. Finalmente se midió el glucógeno en los sobrenadantes usando un kit fluorométrico de glucógeno comercial.

4.2. Técnicas microscópicas.

4.2.1. Marcaje fluorescente.

Para los ensayos de la cuantificación de la adhesión de los monocitos a las EA.hy926 se utilizaron las células THP-1. Para el marcaje fluorescente de estas, 5×10^6 células/mL se resuspendieron en el RPMI (glucosa 11,1 mM; glutamina 2 mM) con calceína a una concentración final de 7,5 μ M durante 30 minutos a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y un 95% de aire. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en el RPMI (glucosa 11,1 mM; glutamina 2 mM), considerando como número mínimo de células viables marcadas más de un 92%. Una vez las células THP-1 estaban marcadas, se incubaban conjuntamente en placas de 24 pocillos (2×10^5 células EA.hy926 por pocillo) durante 1 h a 37°C en una atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ y un 95% de aire.

Finalmente, las células THP-1 no adheridas se eliminaron mediante lavados con PBS, para posteriormente añadir 1 ml del RPMI (glucosa 11,1 mM; glutamina 2 mM) y observar la fluorescencia con un microscopio de fluorescencia invertido Leica AF6000 LX (longitud de onda de excitación de 488 nm y longitud de onda de emisión 515 nm).

4.2.2. Tinción histológica.

Las secciones tisulares de riñón y aorta se tiñeron con *hematoxilina y eosina* (H&E, de las siglas en inglés hematoxylin and eosin) o *ácido periódico de Schiff* (PAS, de las siglas en inglés periodic acid Schiff), respectivamente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evaluar el daño histopatológico, se adquirieron imágenes de las secciones con aumentos 200x y/o 400x, utilizando una cámara digital (Cámara Leica DFC 320, L'Hospitalet de Llobregat, España) conectada al microscopio (Leica DM LB2). A continuación, se realizó un análisis morfométrico con el software ImageJ v1.52j (Institutos Nacionales de Salud: rsb.info. - nih.gov/ij) y el complemento de deconvolución

Material y métodos

de color. Estos análisis se realizaron por dos investigadores diferentes de manera ciega.

El daño glomerular y tubular se evaluó de la siguiente manera: el área glomerular (μm^2) se definió trazando el contorno del glomérulo como la región de interés; la expansión mesangial se definió como el área PAS positiva y libre de núcleos en la matriz mesangial, dividida entre el área PAS positiva y libre de núcleos en el glomérulo; el espacio de Bowman (μm^2) se calculó restando el área del borde glomerular del contorno de cada glomérulo del área del glomérulo; el tamaño tubular cortical, que representa la dilatación tubular, se calculó trazando el contorno de cada túbulo (μm^2); el grosor del epitelio tubular se calculó restando la medida de la membrana apical a la medida del perfil tubular (μm^2); el área cortical hialina se calculó como el porcentaje de la corteza ocupada por el área PAS positiva (μm^2) en diez túbulos corticales renales por riñón en campos seleccionados al azar. Todas las medidas se calcularon a partir de la media de diez campos para cada riñón.

El daño vascular se evaluó de la siguiente manera: el diámetro aórtico se definió midiendo cuatro diámetros internos en ángulo recto (μm); la relación grosor/diámetro se definió como el grosor aórtico, dividido entre el diámetro aórtico. Dichas medidas se calcularon a partir de la media de diez campos de aorta por cada animal.

4.2.3. Marcaje inmunohistoquímico.

Las secciones corticales renales se incubaron con los anticuerpos primarios PCNA, p-Nrf2, p-mTOR, SIRT-1, TNF- α , IL-6, p-p65-NF- κ B, MCP-1 y CD68; las secciones aórticas se incubaron con p-Nrf2, metalotioneína, SIRT-1, TNF- α , IL-6, p-p65, MCP-1, NOS2, COX-2, VCAM-1 e ICAM-1 y las secciones colónicas con PCNA, ZO-1, TNF- α , IL-6, MCP-1, CD45, ciclinaE y p21 respectivamente, durante toda la noche a 4°C. A continuación, se añadió el anticuerpo secundario conjugado con HRP, para finalmente revelarlo con el sustrato DAB y contrastarlas con H&E. En las imágenes obtenidas con el microscopio, el color marrón corresponde a la inmunotinción proteica específica y el color azul claro es la tinción de la hematoxilina nuclear. Se obtuvieron imágenes de secciones con aumentos a 200x y/o 400x, utilizando una cámara digital (Cámara Leica DFC 320, L'Hospitalet de Llobregat, España) conectada al microscopio (Leica DM LB2). El *índice de marcajes nucleares* (LI, de sus siglas en inglés Labelling Index) se calculó como la relación entre el número de núcleos inmunopositivos y el número de núcleos totales (PCNA-LI, p-Nrf2-LI). Los valores de p-mTOR, SIRT-1, ZO-1, TNF- α , IL-6, p-p65- NF- κ B, MCP-1, CD68, Metalotioneína, NOS2, COX-2, VCAM-1 e ICAM-1 se calcularon por la puntuación de inmunorreactividad asignando valores entre 0-5 en función de

las distintas intensidades de color marrón. Los valores de estas proteínas también se calcularon como el porcentaje del área teñida con respecto al área total, utilizando el complemento de deconvolución de color del software ImageJ v1.52j (National Institutes of Health: rsb.info.nih.gov/ij). Se analizaron al menos seis secciones por grupo, y dichas secciones fueron examinadas por dos investigadores diferentes de manera ciega. Dichas áreas se calcularon a partir de la media de diez campos corticales de riñón, de arteria o de colon por cada animal.

4.2.4. Ensayo de marcaje del dUTP terminal por la transferasa.

Para el ensayo de *marcaje del dUTP terminal por la transferasa* (TUNEL, de sus siglas en inglés terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) las secciones corticales renales y colónicas se permeabilizaron con proteinasa K durante 15 minutos a 37°C, y se trataron con H₂O₂ al 3% durante 5 minutos para inhibir la actividad de las peroxidasas endógenas. Después de un lavado completo con tampón fosfato, las secciones se incubaron con tampón de equilibrado durante 10 minutos, seguido de la aplicación inmediata de la enzima TdT, bajo condiciones de humedad durante 1 hora a 37°C. Transcurrido este tiempo, la reacción se detuvo y los nucleótidos biotinilados incorporados se detectaron por estreptavidina conjugada con peroxidasa, y posterior tinción con DAB y contratinción con verde de metilo.

Se obtuvieron imágenes de secciones con aumentos a 400x, utilizando una cámara digital (Cámara Leica DFC 320, L'Hospitalet de Llobregat, España) conectada a un microscopio (Leica DM LB2). El índice apoptótico se calculó como el número de células marcadas (células teñidas de marrón) dividido por el número de células totales. Dicho índice se calculó a partir de la media de cincuenta campos corticales de riñón o colon por cada animal.

4.3. Técnicas vasculares.

4.3.1. Monitorización hemodinámica.

Las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina 80 mg/Kg de peso y xilacina 8 mg/Kg de peso, se le practicó una traqueotomía y recibieron ventilación de manera artificial con aire del ambiente [(volumen ventilación 9 ml/Kg, 60 respiraciones por minuto, y una presión de espiración final de 2 cm H₂O) Nemi Scientific Inc, Medway, Estados Unidos]. La sSAP, dSAP y mSAP se midió mediante la canulación de la arteria carótida en animales con el pecho cerrado. Finalmente, las ratas se sacrificaron por punción cardíaca.

4.3.2. Reactividad vascular.

El cayado aórtico se seccionó y se montó en forma de anillos aórticos (presentando un diámetro de 2 mm y una longitud de entre 3 y 4 mm aproximadamente) en un baño de órganos con solución de Krebs a 37°C, y gaseados con una mezcla de O₂ 21% y CO₂ 5%. Después de someter a una tensión de estiramiento en reposo de 2 g, los anillos aórticos se trataron secuencialmente con agentes vasoconstrictores, como KCl 80 mmol/L y fenilefrina 1-10000 nmol/L. A continuación, los anillos se lavaron tres veces con solución de Krebs libre de agentes vasoconstrictores y se dejaron recuperar durante 30 min. Por último, los anillos se trataron nuevamente con una concentración de fenilefrina suficiente para inducir una contracción del 75% de la respuesta obtenida con KCl; además, los anillos aórticos se sometieron a una curva dosis respuesta a acetilcolina 1-10000 nmol/L o nitroprusiato de sodio 0,1-1000 nmol/L.

4.4. Técnicas genéticas.

El ADN se extrajo de muestras fecales utilizando columnas G-spin (INTRON Biotechnology), determinando su concentración con el reactivo PicoGreen Quant-IT. A continuación, 3 ng del ADN extraído se usó para amplificar la región V3-V4 del gen ARNr 16S mediante la *reacción en cadena de la polimerasa* (PCR, de las siglas en inglés polymerase chain reaction), dando lugar a unos fragmentos de aproximadamente 450 pb que incluían colas de extensión identificativas. El paso siguiente fue adicionar secuencias específicas de Illumina mediante una nueva PCR con un número de ciclos bajos, dando lugar a unos fragmentos denominados amplicones que se analizaron usando un Bioanalizador 2100 (Agilent technologies, California, Estados Unidos), con lo que se obtuvo una mezcla de muestras en cantidades equimolares. Esta mezcla se purificó aún más y se cuantificó la concentración exacta mediante una PCR en tiempo real (Kapa Biosystems, Inc., Basilea, Suiza).

Finalmente, las muestras se secuenciaron en un instrumento Illumina MiSeq con capacidad de lectura de 2x300 secuencias en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (Madrid, España). Se utilizó la herramienta BIPES para procesar las secuencias en bruto y usando algoritmos UCHIME (USEARCH 6.1) se eliminaron secuencias quiméricas en el modo *di novo*, identificándose entre 90000 y 220000 secuencias por muestra mediante el software 16S Metagenomics 1.0.1.0 de Illumina. Las secuencias obtenidas se agruparon en *unidades taxonómicas operativas* (OTUs, de sus siglas en inglés operational taxonomic units) utilizando USEARCH 6.1, estableciendo la distancia umbral en 0,03, con lo que cuando la similitud entre dos secuencias

de ARNr 16S fue del 97%, las secuencias se clasificaron como la misma OTU. Las secuencias alineadas procedentes de QIIME 2 se analizaron usando PyNAST tomando como plantilla la base de datos Greengenes 13_8. A continuación, para clasificar las secuencias obtenidas en taxones específicos se utilizó el algoritmo de la base de datos del Proyecto Ribosoma, seguido de la clasificación e identificación de nomenclatura de estas usando la base de datos de Taxonomía (Centro Nacional de Información Biotecnológica). Finalmente, los taxones bacterianos identificados se clasificaron según el SCFA que son capaces de generar.

4.5. Técnicas cromatográficas.

4.5.1. Cromatografía de gases.

Para la cuantificación de los SCFAs, las muestras fecales frescas se pesaron y se suspendieron en 1 mL de agua con ácido fosfórico 0,5% por cada 0,1 g de muestra, e inmediatamente se congelaron a -20°C . Una vez descongeladas, las suspensiones fecales se homogeneizaron con un vórtex durante 2 minutos y se centrifugaron durante 10 minutos a 17949 g. Del sobrenadante obtenido se tomaron 400 μL y se diluyeron con 100 μL de ácido 4-metilvalérico (utilizado como patrón interno a una concentración final de 788 μM). A continuación, la solución obtenida se extrajo con 1 mL de n-butanol durante 21 min y se centrifugó durante 105 min a 16000 g. En el sobrenadante resultante se midieron los SCFAs con un equipo de Cromatografía de Gases Agilent 7890A acoplado a un Espectrómetro de Masas Simple Cuadrupolo Agilent 5975C (Agilent technologies, California, Estados Unidos). Una solución madre que contenía la mezcla de estándares (WSFA-2; Sigma-Aldrich, Madrid, España), que se sometió al mismo proceso de extracción que las muestras, se diluyó para obtener una curva de calibración que contenía concentraciones de 2 a 10000 μM . Finalmente, las concentraciones de acetato, propionato y butirato obtenidas se expresaron como $\mu\text{M/g}$ de muestra.

4.5.2. Cromatografía de intercambio iónico.

Para la determinación del lactato, las muestras fecales se descongelaron, pesaron, y se suspendieron en agua MilliQ. A continuación, las muestras se homogenizaron con un procesador de líquidos ultrasónico Vibra-Cell CV18 (Sonics & Materials, Connecticut, Estados Unidos), y las suspensiones fecales resultantes se centrifugaron a 1000 g durante 5 min. El sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa 0,2 μm (VWR International, Barcelona, España). Después de la filtración, se midió el lactato con un equipo avanzado de Cromatografía Iónica Compacta IC867 (Metrohm AG, Herisau,

Material y métodos

Suiza), utilizando como estándar de calibración el L-lactato de sodio (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Finalmente, las concentraciones de lactato obtenidas se expresaron como $\mu\text{M/g}$ de muestra.

5. Análisis estadístico.

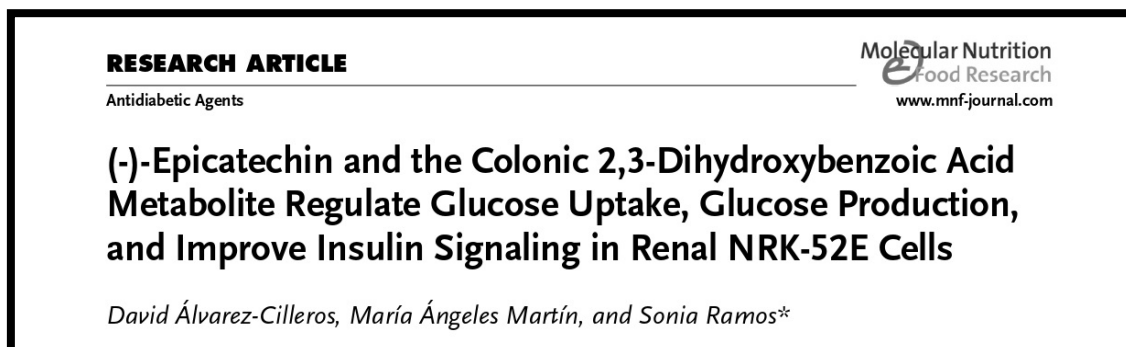
Para determinar la normalidad y la homogeneidad de las varianzas de los datos obtenidos se utilizaron las pruebas de D'Agostino, de Pearson y de Levene; para las comparaciones múltiples, se utilizó el *análisis de la varianza* (ANOVA) de una vía, seguida de la prueba de Bonferroni o Tukey cuando las variaciones eran homogéneas o de la prueba de Tamhane cuando las variaciones no lo eran, considerando las diferencias significativas cuando $p < 0,05$. Para evaluar el grado de relación entre los parámetros se utilizó la prueba de correlación de Pearson de dos colas, considerando la correlación positiva significativa cuando $r > 0,5$, y negativa cuando $r < -0,5$. Para todo ello se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism versión 7.00 (GraphPad software Inc., La Jolla, California).

Para determinar la diversidad α se utilizaron los índices de Shannon, Chao y Simpson, normalizando las lecturas de cada OTU con las lecturas totales de cada muestra. Para evaluar la diversidad β se utilizaron los estudios de clasificación no supervisados mediante *análisis de componentes principales* (PCA, de sus siglas en inglés principal component analysis). Para llevar a cabo todo ello se utilizó el programa estadístico QIIME 2.

1. Capítulo primero - Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo renal en modelos de experimentación.

1.1. Resumen de los estudios en células renales en cultivo.

1.1.1. Artículo I.



La DN es una de las complicaciones microvasculares diabéticas más comunes en estos pacientes y, también, una de las principales causas de la enfermedad renal terminal. En la DN, la hiperglucemia crónica se asocia con los cambios túbulo-intersticiales que acompañan a la disfunción renal. Por ello, el control a largo plazo de la glucemia constituye una herramienta valiosa que contribuye a prevenir la nefropatía. En este sentido, diversas evidencias han mostrado que los flavonoides podrían poseer efectos antidiabéticos. De manera más concreta, se ha sugerido que la EC y los principales ácidos fenólicos colónicos derivados de la ingesta de flavonoides (el DHBA, el DHPAA, el HPPA y el VA) ejercen efectos beneficiosos en la diabetes, aunque el mecanismo por el cual llevan a cabo este efecto sigue siendo desconocido en la actualidad.

El objetivo de este estudio fue evaluar la modulación de la homeostasis glucídica y la regulación de la señalización de la insulina por los compuestos mencionados anteriormente en las células renales NRK-52E. Para ello, se han evaluado los niveles del GLUT-2 y del SGLT-2, la producción y captación de glucosa, así como las proteínas claves de la ruta de señalización de la insulina (el IR, el IRS-1 y la PI3K/AKT) y de la gluconeogénesis (la PEPCK).

En condiciones fisiológicas, el tratamiento de las células NRK-52E con la EC (5-20 μ M) y con el DHBA (20 μ M) durante 24 horas redujo la producción y la captación de glucosa, sin modificar los niveles del GLUT-2 y del SGLT-2. Además, ambos compuestos fueron capaces de disminuir la expresión de la PEPCK mediante la activación de la AKT, así como de incrementar los niveles fosforilados y totales de las proteínas IR e IRS-1.

Estos resultados han permitido concluir que, en condiciones fisiológicas, el tratamiento de las células NRK-52E con la EC y el DHBA regulan la

Resultados – Capítulo primero

homeostasis glucídica renal mediante la modulación de los procesos de producción y captación de glucosa, y fortalecen la vía de señalización de la insulina por la activación de proteínas claves de la ruta.

La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por la puesta a punto del modelo *in vitro*, así como por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: la viabilidad por cristal violeta, la producción y la captación de glucosa, la IP y el WB. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.

RESEARCH ARTICLE

Antidiabetic Agents

Molecular Nutrition
Food Research
www.mnf-journal.com

(-)-Epicatechin and the Colonic 2,3-Dihydroxybenzoic Acid Metabolite Regulate Glucose Uptake, Glucose Production, and Improve Insulin Signaling in Renal NRK-52E Cells

David Álvarez-Cilleros, María Ángeles Martín, and Sonia Ramos*

Scope: (-)-Epicatechin (EC) and main colonic phenolic acids derived from flavonoid intake, such as 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPPA), 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA), and vanillic acid (VA), have been suggested to exert beneficial effects in diabetes, although the mechanism for their actions remains unknown. In this study, the modulation of glucose homeostasis and insulin signaling by the mentioned compounds on renal proximal tubular NRK-52E cells is investigated.

Methods and results: Levels of the glucose transporters SGLT-2 and GLUT-2, as well as glucose uptake, glucose production, and key proteins of the insulin pathways, namely insulin receptor (IR), insulin receptor substrate-1 (IRS-1), and PI3K/AKT pathway are analyzed. EC (5–20 μM) and DHBA (20 μM) reduced both renal glucose uptake and production. Interestingly, EC and DHBA did not modify the levels of SGLT-2 and GLUT-2, and modulated the expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase via AKT leading to a diminished glucose production. EC and DHBA also enhanced the tyrosine phosphorylation and total IR and IRS-1 levels, and activated the PI3K/AKT pathway in NRK-52E cells.

Conclusion: EC and DHBA regulate the renal glucose homeostasis by modulating both glucose uptake and production, and strengthen the insulin signaling by activating key proteins of that pathway in NRK-52E cells.

reabsorption has been considered to have a pathophysiological role in diabetes.^[1] Therefore, a long-term reduction in hyperglycemia is an important treatment in preventing nephropathy.

Kidneys play a major role in glucose homeostasis. The main site for glucose reabsorption is the early S1 segment of the proximal tubule and this process is largely mediated by the high-capacity transporter sodium-glucose co-transporter-2 (SGLT-2).^[2] In this regard, inhibitors of SGLT-2 have been demonstrated to increase glycosuria and reduce hyperglycemia in type 2 diabetes.^[3,4] Importantly, the gluconeogenesis is a differentiated function of the renal cortex that also contributes to the glucose homeostasis, as well as to the insulin modulatory effects.^[2] In diabetes, there is a marked increase in renal glucose uptake, which might be accompanied by the upregulation of SGLT-2 and glucose transporter-2 (GLUT-2) levels, and the renal gluconeogenesis is enhanced because of the deregulation of rate-limiting gluconeogenic enzymes.^[2,4,5] Additionally, defects in the insulin signaling are thought

to affect the renal glucose homeostasis and, therefore, contribute to the hyperglycemia.^[4] Consequently, treatments aimed at improving glucose homeostasis in renal cells are considered critical for optimal management of diabetes type 2 and to prevent, retard, or treat associated renal complications.

Flavanols, such as (-)-epicatechin (EC), are a group of polyphenols abundant in cocoa, grapes, tea, and many other fruits and vegetables^[6,7] with demonstrated health beneficial effects, including antidiabetic properties.^[7,8] However, it should be considered that their health effects depend on their bioavailability.^[7,9] Thus, monomers are readily absorbed in the small intestine, but oligomers and polymers are metabolized in the colon by the intestinal microbiota into different phenolic acids of low molecular weight.^[7,9] These microbial metabolites are further absorbed and circulate in the body prior to their excretion in urine, and represent a very large percentage of the amount ingested. Accordingly, food polyphenols and microbial-derived metabolites should be taken into account when assessing the impact of polyphenols on health. In this regard, mono- and dihydroxylated phenylpropionic

1. Introduction

Diabetes nephropathy is a major complication of diabetes and a leading cause of end-stage renal disease.^[1] Chronic hyperglycemia is associated with tubule-interstitial changes that accompany progressive renal dysfunction;^[1,2] indeed, renal glucose

D. Á. Cilleros, Dr. M. Á. Martín, Dr. S. Ramos
Department of Metabolism and Nutrition
Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)
José Antonio Novais 10
Ciudad Universitaria
Madrid, Spain
E-mail: s.ramos@ictan.csic.es
Dr. M. Á. Martín
Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM)
ISCIII
Spain

DOI: 10.1002/mnfr.201700470

Mol. Nutr. Food Res. 2018, 1700470

1700470 (1 of 9)

© 2017 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

and phenylacetic acids have been found as main colonic phenolic acids derived from flavanol intake,^[9] and, similarly to the monomer EC, exhibit potential health beneficial effects.^[7,9,10] EC and some colonic polyphenolic metabolites were able to exert insulin-like activities,^[10–12] counteract key features of diabetic complications,^[13,14] improve insulin sensitivity,^[15,16] as well as blood glucose levels,^[13,17] and protect the functionality of insulin-sensitive tissues in diabetes.^[10,15–19] However, to the best of our knowledge, whether EC and the microbial phenolic metabolites derived from flavanol intake have an effect on renal tubular cells is unclear, and the precise mechanism for their potential preventive activities related to glucose metabolism and insulin signaling in the kidney has not been studied.

The aim of this study is to evaluate the effects of EC and the colonic-derived flavonoid metabolites 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA), and vanillic acid (VA) on key modulatory mechanisms related to the glucose homeostasis in renal proximal tubular NRK-52E cells, including glucose uptake, glucose production, and insulin signaling pathways.

2. Experimental Section

2.1. Materials and Chemicals

(-)-EC (>95% purity), DHBA (≥99% purity), DHPAA (>98% purity), HPPA (>98% purity), VA (>97% purity), LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride), phlorizin, anti-mouse IgG-agarose, and sodium lactate were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). The fluorescent probe D-glucose, 2-deoxy-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino) (2-NBDG) was from Molecular Probes (Invitrogen, Madrid, Spain). Anti-protein kinase B (AKT) and anti-phospho-Ser473-AKT detecting levels of phospho- and total AKT, anti-glycogen synthase kinase-3 α/β (GSK3), and anti-phospho-GSK3 α/β recognizing phosphorylated Ser21/9 of GSK3, as well as anti-glycogen synthase (GS) and anti-phospho-GS recognizing phosphorylated Ser641 of GS, and anti- β -actin were obtained from Cell Signalling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-insulin receptor- β (IR β), anti-SGLT-2, anti-phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), and anti-Tyr(P) (PY20) were purchased from Santa Cruz (sc-711, sc-98975, sc-32879, and sc-508, respectively; Qimigen, Madrid, Spain). Anti-insulin receptor substrate-1 (IRS-1) and anti-GLUT-2 were from Millipore (Madrid, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis were from BioRad (BioRad Laboratories S.A., Madrid, Spain). Cell culture dishes, glutamine, and cell culture medium were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and Lonza (Madrid, Spain), respectively.

2.2. Cell Culture and Treatments

Rat NRK-52E cells (kindly provided by Prof. Dr. Patricio Aller, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain) were grown in DMEM medium containing 5.5 mM D-glucose and 2 mM glutamine, supplemented with 10% fetal bovine serum

(FBS). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Cells were treated with different concentrations of EC, DHBA, DHPAA, HPPA, or VA (1–20 μ M) diluted in serum-free culture medium with 5.5 mM D-glucose and 2 mM glutamine for 24 h. In the experiments with the inhibitors, cells were preincubated with 20 μ M LY294002 or 0.5 mM phlorizin for 1 h prior to 24 h of EC or DHBA treatment.

2.3. Cell Viability Assay

Cell viability was determined by using the crystal violet assay.^[12] NRK-52E cells were seeded at low density (10⁴ cells per well) in 96-well plates, grown for 20 h, and incubated with crystal violet (0.2% in ethanol) for 20 min. Plates were rinsed with water, allowed to dry, and 1% SDS was added. The absorbance of each well was measured using a microplate reader at 570 nm.

2.4. Glucose Uptake

Cellular glucose uptake was quantified by the 2-NBDG assay using a microplate reader. Cells were plated in 24-well plates at a rate of 2×10^5 cells per well and after the treatments, 2-NBDG was added at 10 μ M final concentration and incubated for 1 h at 37 °C. Then, cells were washed twice with PBS, serum-free medium was added, and the fluorescence intensity was immediately measured in a microplate reader at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. After being taken by the cells, 2-NBDG was converted into a non-fluorescent derivative (2-NBDG metabolite). A fair estimation of the overall glucose uptake was obtained by quantifying the diminution in the fluorescence. The assay has been described elsewhere.^[19,20]

2.5. Glucose Production Assay

NRK-52E cells were seeded in 24-well plates (2×10^5 cells per well) and after the treatment, the medium was replaced with glucose production buffer consisting of glucose-free DMEM (pH 7.4) without phenol red (Invitrogen, Madrid, Spain), supplemented with 5 mM sodium lactate and 5 mM glutamine, as previously described.^[12,21,22] After 1.5 h of incubation, medium was collected and the glucose concentration was measured with a colorimetric glucose assay kit (Sigma, Madrid, Spain). The readings were then normalized to the total protein content determined from the whole-cell lysates.

2.6. Preparation of Cell Lysates

Cells were lysed at 4 °C in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, 200 mM β -glycerolphosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 2 μ g mL⁻¹ leupeptin, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The supernatants were collected, assayed for

protein concentration by using the Bio-Rad (Bio-Rad, Madrid, Spain) protein assay kit according to the manufacturer's specifications, aliquoted, and stored at -80°C until used for immunoprecipitation and/or Western blot analyses.

2.7. Immunoprecipitation

Protein extracts containing 200 μg of protein were immunoprecipitated overnight at 4°C with gentle rotation in the presence of 2–5 μg of anti-Tyr(P) (PY20) antibody, followed by the addition of anti-mouse IgG-agarose. After mixing for 2 h, the pellets were collected by centrifugation, and the supernatants were discarded. Then, the pellets were washed and saved for Western blot analyses.

2.8. Western Blot Analysis

Equal amounts of proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride filters (Bio-Rad, Madrid, Spain). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, Madrid, Spain) or anti-mouse (Sigma, Madrid, Spain) immunoglobulin. Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Normalization of Western blot was ensured by β -actin and bands were quantified using a scanner and accompanying software.

2.9. Statistics

Prior to statistical analysis, data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene; for multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by the Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. $p < 0.05$ was considered significant. An SPSS version 23.0 program was used.

3. Results

3.1. Effects of EC and Colonic Phenolic Metabolites on Cell Viability

To discard the potential toxic effects of EC, DHBA, DHPAA, HPPA, and VA on a renal tubular cell line (NRK-52E), cells were exposed to a range of concentrations (1–100 μM) for 24 h.

Treatment of NRK-52E cells for 24 h with EC or any of the mentioned microbial phenolic metabolites did not evoke changes in cell viability, as determined by the crystal violet assay, indicating that the concentrations selected for the study did not damage cell integrity during the period of incubation (Supporting Information Table 1). Therefore, the lowest and realistic range of concentrations was selected for further studies.^[12]

Table 1. Effect on glucose uptake and glucose production of EC, DHBA, DHPAA, HPPA and VA calculated as percent of the relative increase or decrease over the control values. Data are means \pm SD of 8–12 different samples per condition.

	2-NBDG uptake (% of controls)	Glucose production (% of controls)
C	100.4 \pm 5.8	100.0 \pm 4.7
EC (μM)		
1	95.2 \pm 11.03	94.0 \pm 10.07
5	110.7 \pm 8.0	82.5 \pm 7.1
10	124.4 \pm 13.1 ^{a)}	64.0 \pm 12.3 ^{a)}
20	140.0 \pm 10.8 ^{a)}	59.7 \pm 8.2 ^{a)}
DHBA (μM)		
1	93.4 \pm 5.5	101.6 \pm 4.8
5	98.6 \pm 10.7	97.4 \pm 8.2
10	100.5 \pm 12.5	96.7 \pm 6.4
20	117.7 \pm 6.6 ^{b)}	72.3 \pm 8.5 ^{b)}
DHPAA (μM)		
1	99.8 \pm 10.1	108.6 \pm 11.3
5	94.8 \pm 10.3	108.9 \pm 6.9
10	106.3 \pm 7.5	110.4 \pm 5.8
20	104.1 \pm 5.7	107.7 \pm 8.7
HPPA (μM)		
1	91.0 \pm 4.2	96.4 \pm 8.7
5	92.1 \pm 4.7	99.6 \pm 5.8
10	92.5 \pm 6.9	107.2 \pm 9.7
20	102.6 \pm 5.8	105.5 \pm 6.0
VA (μM)		
1	97.0 \pm 9.5	104.9 \pm 9.7
5	98.4 \pm 8.9	111.0 \pm 10.4
10	94.3 \pm 7.9	99.0 \pm 7.8
20	92.5 \pm 8.2	93.5 \pm 8.4

a) $p < 0.05$, C versus EC;

b) $p < 0.05$, C versus DHBA.

3.2. Effects of EC and Colonic Phenolic Metabolites on Glucose Uptake and Glucose Production

To investigate whether the exposure of renal tubular cells to EC or colonic phenolic metabolites can modulate both glucose uptake and production, NRK-52E cells were incubated with 1–20 μM of EC, DHBA, DHPAA, HPPA, or VA for 24 h.

As shown in Table 1, treatment of cells with EC and DHBA, but not with DHPAA, HPPA, or VA, decreased the glucose production. Similarly, the glucose uptake was reduced (as indicated by the increase in the percentage of 2-NBDG uptake) after incubating the cells with EC and DHBA, but not with DHPAA, HPPA, or VA. The mentioned diminution in both parameters (glucose uptake and glucose production) was observed at 10–20 μM EC and 20 μM DHBA, respectively. Then, for subsequent experiments 5 and 10 μM EC, and 10 and 20 μM DHBA were selected, as these doses comprised the lowest concentrations of both compounds showing an effect on glucose uptake and production.

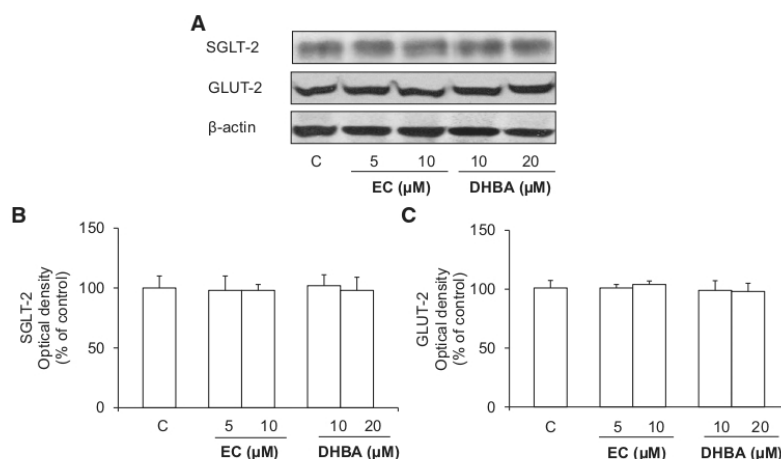


Figure 1. Effect of EC and DHBA on SGLT-2 and GLUT-2 levels in NRK-52E cells after 24 h of treatment. A) Bands of representative experiments. Percentage data of B) SGLT-2 and C) GLUT-2 relative to the control condition (means \pm SD, $n = 9-12$). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. No significant differences were found for C versus EC, and C versus DHBA ($p < 0.05$).

3.3. Effects of EC and DHBA on Glucose Transporter Protein Levels

Glucose uptake was modulated by EC and DHBA in NRK-52E cells, then the levels of the main glucose transporters in renal tubular cells were evaluated after incubating the cells with 5 and 10 μ M EC, and 10 and 20 μ M DHBA, respectively, for 24 h.

Treatment of NRK-52E cells with the concentrations selected for EC or DHBA did not affect the expression levels of SGLT-2 and GLUT-2 (Figure 1).

3.4. Effect of EC and DHBA on PEPCK Levels

Because glucose production was diminished by EC and DHBA in NRK-52E cells, the expression levels of a major enzyme responsible of the regulation of gluconeogenesis, such as PEPCK, were analyzed after 24 h EC- or DHBA-treatment.

EC or DHBA incubation decreased PEPCK levels, as illustrated in Figure 2. EC (10 μ M) induced the highest diminution in the levels of PEPCK in comparison to the other dose of EC ($p < 0.05$). DHBA equally reduced the levels of PEPCK at the highest concentration assayed ($p < 0.05$, Figure 2).

3.5. Effects of EC and DHBA on Tyrosine Phosphorylation and Protein Levels of IR and its Substrate IRS-1

The modulation of IR and its downstream substrate IRS-1 is essential for maintaining the glucose homeostasis, and constitute the first steps for recruiting and activating downstream pathways.^[23,24] To test the effect of EC and DHBA on tyrosine phosphorylation and total levels of IR and IRS-1, NRK-52E cells

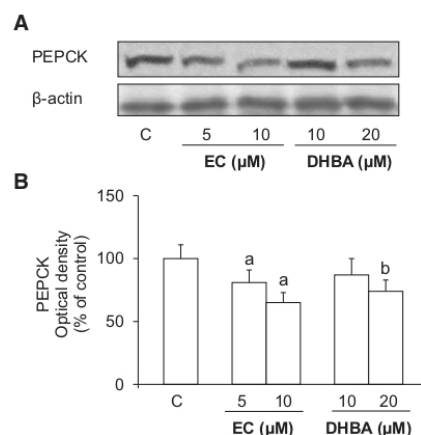


Figure 2. Effect of EC and DHBA on levels of PEPCK in NRK-52E cells after 24 h of incubation. A) Bands of representative experiments. B) Densitometric quantification of PEPCK. Values are expressed as a percentage relative to the untreated control condition and are means \pm SD, $n = 6-8$. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. a) $p < 0.05$, C versus EC; b) $p < 0.05$, C versus DHBA.

were exposed for 24 h to the previously mentioned concentrations of these compounds.

As shown in Figure 3, IR and IRS-1 phosphorylation and total protein levels equally increased in the presence of the highest concentrations of EC and DHBA tested, that is 10 and 20 μ M, respectively ($p < 0.05$). However, the lowest doses of both compounds (5 μ M EC and 10 μ M DHBA) seemed not to modify the levels of these proteins as they showed comparable values of phosphorylation and total IR and IRS-1 proteins to those of untreated cells.

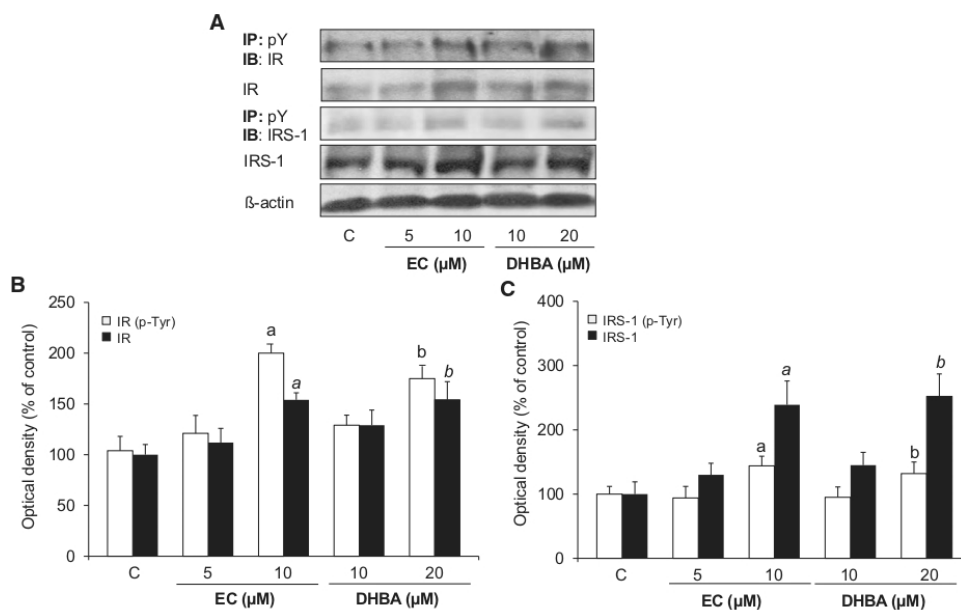


Figure 3. Effect of EC and DHBA on phosphorylated and total levels of IR and IRS-1 in NRK-52E cells after 24 h of treatment. A) Bands of representative experiments. Densitometric quantification of B) p-IR and total IR, and C) p-IRS-1 and total IRS-1. Protein extracts were subjected to immunoprecipitation with the anti-phospho-tyrosine (P-Tyr) antibody. The resulting immunocomplexes were analyzed by Western blot with the anti-IR or IRS-1 antibody. Values are expressed as a percentage relative to the control condition (means \pm SD, $n = 7-10$). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. a) $p < 0.05$, C versus EC; b) $p < 0.05$, C versus DHBA. Different styles of letters (normal and italics) have been used for each parameter depicted within the same graph.

3.6. Effects of EC and DHBA on AKT, GSK3, and GS Phosphorylation

Following the study of the insulin cascade, phosphorylation and total levels of AKT, GSK3, and GS were evaluated in cell lysates by Western blot. AKT facilitates glycogen synthesis, as its stimulation inhibits GSK-3 by phosphorylation, which subsequently phosphorylates and inactivates GS.^[7,25]

EC and DHBA enhanced the phosphorylated levels of AKT and GSK3 at the highest dose used for each phenolic compound (Figure 4A–C). In agreement with these results, 10 μ M EC and 20 μ M DHBA diminished the phosphorylated levels of GS (Figure 4A and D). There was no difference in the total levels of AKT, GSK3, and GS.

3.7. Effect of EC and DHBA Activation of AKT on Gluconeogenesis

Kidney produces glucose and some studies support the role of AKT in the repression of PEPCK.^[26] In view of the increased levels of p-AKT induced by EC and DHBA, it was studied whether any of these substances were able to modulate the expression of PEPCK, and the production of glucose via AKT. To this end, NRK-52E cells were exposed to a selective inhibitor of AKT (LY294002) for 1 h followed by a 24-h incubation with EC or DHBA, and then

the levels of PEPCK and de novo production of glucose were assayed. The concentrations selected for these analyses were the doses that clearly activated the AKT pathway, i.e., 10 μ M for EC and 20 μ M for DHBA.

Treatment of NRK-52E cells with EC or DHBA alone showed a comparable diminution in the expression of PEPCK ($p < 0.05$, Figure 5A and B). LY294002 alone increased the levels of PEPCK, although these values decreased by the addition of EC and DHBA ($p < 0.05$, Figure 5A and B). LY294002 treatment diminished p-AKT levels in all cells incubated with this inhibitor, although p-AKT values were partly recovered in the presence of EC or DHBA when compared to untreated cells ($p < 0.05$, Figure 5A and C). In addition, the AKT selective inhibitor alone increased the glucose production, and this enhancement was less prominent in the cells treated with EC or DHBA and LY294002 (Figure 5D, $p < 0.05$). Conversely, LY294002 could not totally block the inhibitory effect of EC and DHBA on PEPCK and glucose production ($p < 0.05$).

3.8. Effect of EC and DHBA Activation of SGLT-2 on Glucose Uptake

SGLT-2 inhibitors are novel antidiabetic agents,^[3,27] and phlorizin (P) is a known SGLT-2 antagonist.^[28] To compare the effects of EC

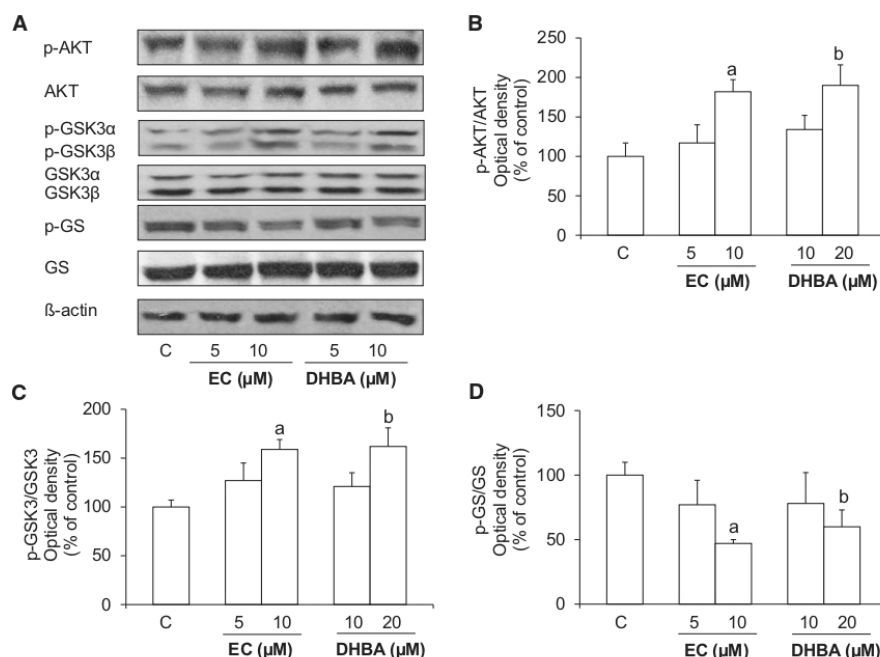


Figure 4. Effect of EC and DHBA on levels of phosphorylated and total AKT, GSK3, and GS in NRK-52E cells. A) Bands of representative experiments. Percentage data of B) p-(Ser473)-AKT/AKT, C) p-(Ser 21/9)-GSK3/GSK3, and D) p-(Ser641)-GS/GS ratios relative to controls. Values are expressed as a percentage relative to the control condition and are means \pm SD, $n = 6-8$. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. a) $p < 0.05$, C versus EC; b) $p < 0.05$, C versus DHBA.

or DHBA with P on the glucose uptake, SGLT-2 was inhibited by incubating the cells with P for 1 h prior to the treatment with EC or DHBA. As mentioned above, the concentrations selected for these analyses were the previously chosen (10 μ M for EC and 20 μ M for DHBA), since they showed a prominent effect on the uptake of glucose.

As illustrated in **Figure 6**, treatment with P, EC, or DHBA alone equally decreased the glucose uptake, that is, increased the percentage of 2-NBDG uptake in comparison to control cells ($p < 0.05$). Similar results were observed after the incubation with EC or DHBA when P was present ($p < 0.05$).

In diabetic patients, the glucose renal transport increases, and the levels of glucose transporters could be modulated.^[5,29] Then, levels of SGLT-2 and GLUT-2 were evaluated by Western blot. SGLT-2 and GLUT-2 expression levels remained unaltered after treating the cells with EC, DHBA, and/or P ($p < 0.05$, Supporting Information Figure 1). All these results suggested that both natural compounds seem to exert the same effect as P.

4. Discussion

Mounting evidence indicating that flavonoids might possess anti-diabetic effects in animals and humans have been reported and these natural compounds have drawn attention because of

their safety.^[7] In this study, it has been demonstrated, for the first time, that EC and the colonic DHBA metabolite diminished the glucose uptake without affecting the levels of main glucose transporters in renal proximal tubular cells. It has also been shown that EC and DHBA enhanced the tyrosine phosphorylation and total IR and IRS-1 levels together with an activation of the PI3K/AKT pathway. In addition, EC and DHBA downregulated the levels of the key gluconeogenic enzyme PEPCK and modulated the renal glucose production via AKT.

EC is the most abundant flavanol in cocoa, although it is also present in lower amounts in beverages and fruits, such as tea and grapes.^[7,30] After ingestion, a small amount of flavonoids is absorbed in the small intestine, but most of them are transformed in the colon into low-molecular-weight metabolites before absorption.^[9] In fact, human studies have shown that the main urinary microbial phenolic acids derived from flavanol intake are mono- and dihydroxylated phenylpropionic and phenylacetic acids, together with hydroxybenzoic acids.^[9] In addition, it should be taken into account that pure compounds are accumulated in tissues as a consequence of a conjugation–deconjugation cycle.^[31] Therefore, in the present work a pure compound and some of the most abundant compounds found in urine after the intake of flavanol-rich foods have been selected to study their effect on glucose uptake and glucose production, as well as on insulin signaling in renal proximal tubular cells.^[9] Moreover, it is

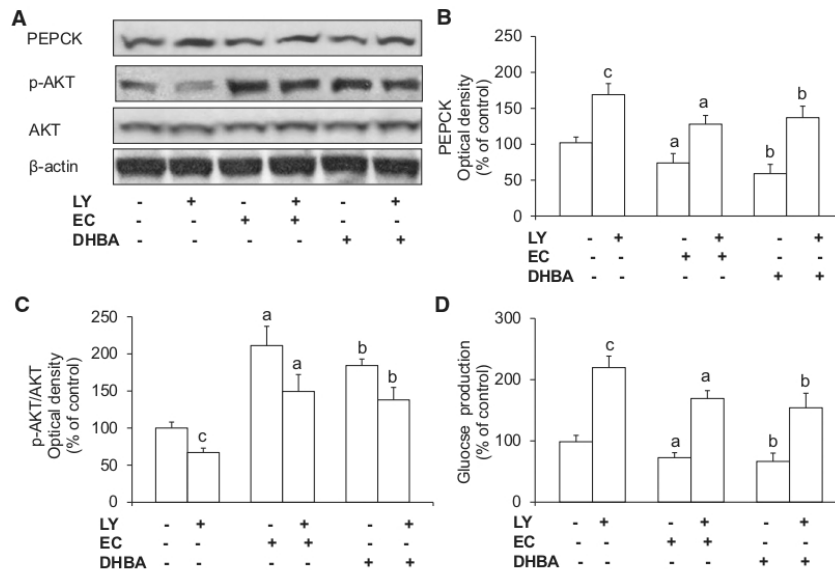


Figure 5. Effect of EC and DHBA and the selective inhibitor LY (LY294002) on levels of PEPCK and phosphorylated and total AKT, and glucose production. NRK-52E cells were incubated in the presence or absence of 20 μ M LY for 1 h and later with 10 μ M EC or 20 μ M DHBA for 24 h. A) Bands of representative experiments. Percentage data of B) PEPCK and C) p-(Ser473)-AKT/AKT relative to the control condition (means \pm SD, $n = 8-11$). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. D) Glucose production was expressed as percent of control are means \pm SD of 10–15 different samples per condition. a) $p < 0.05$, C versus EC; b) $p < 0.05$, C versus DHBA; and c) $p < 0.05$, C versus LY.

worth mentioning that the range of concentrations used in the study is not far from realistic concentration. Indeed, concentrations ranging between 0.1–20 μ M have been found in biological fluids after the intake of flavanols and they are considered within the range recommended for in vitro studies.^[9,32]

Kidneys play an important role in glucose homeostasis via gluconeogenesis, glucose uptake from the circulation, and glucose recovery from the urine.^[2] Likewise, recent studies have suggested a role for the insulin signaling in the kidney on the modulation of glucose levels.^[24] Currently, there is a wide range of antidiabetic agents, but many of them cannot achieve and maintain satisfactory glycemic levels; thus, new agents are still in great demand. In this line, natural compounds, such as flavonoids, could play a major role, although little investigation at the molecular level has been performed.

In the renal proximal tubular cells, SGLT-2 reabsorbs $\approx 90\%$ of the filtered glucose, and the transcellular glucose transport is facilitated by GLUT-2.^[2,5] In the present study, EC and DHBA did not show any effect on the protein levels of SGLT-2 and GLUT-2, and both substances diminished the glucose uptake. To the best of our knowledge, the influence of phenolic compounds on both transporters has not been evaluated in renal tubular cells previously, although it has been reported that in the renal proximal tubule GLUT-2 expression levels correlate with glycemia,^[2] and that GLUT-2 and SGLT-2 levels increase or remain unaltered in renal proximal tubular cells from diabetic patients^[5,29]; all this could explain the lack of effect of EC and DHBA on the levels of both transporters. Similarly, we have recently shown that EC did

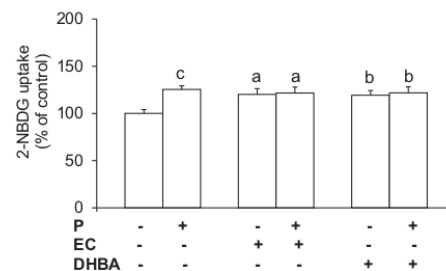


Figure 6. Effect of EC and DHBA and the SGLT-2 inhibitor phlorizin (P) on glucose uptake. NRK-52E cells were incubated in the presence or absence of 0.5 mM P for 1 h and later with 10 μ M EC or 20 μ M DHBA. Glucose uptake was expressed as percent of control are means \pm SD of 8–14 different samples per condition. a) $p < 0.05$, C versus EC; b) $p < 0.05$, C versus DHBA; c) $p < 0.05$, C versus P.

not modulate the protein levels of GLUT-2 in hepatic cells.^[12] In addition, it should be mentioned that different natural products, including P and flavonoid enriched plant extracts, inhibit SGLT-2, which contributed to reduce the glycemia.^[33] In this line, our results could suggest that EC and DHBA could contribute to decrease the glucose uptake by inhibiting SGLT-2 without altering the expression of the glucose transporters, as described for dapagliflozin, empagliflozin, P, or other natural products.^[3,28,33,34]

Renal gluconeogenesis predominantly occurs in the proximal tubular cells.^[2,4] Indeed, renal proximal tubular cells are particularly sensitive to the hyperglycemia because the glucose uptake is insulin-independent.^[2,4] By contrast, insulin inhibits gluconeogenesis through the downregulation of gluconeogenic genes, being PEPCK one of the major enzymes responsible of the modulation of this process.^[2,4] In the present work, EC and DHBA decreased PEPCK levels in NRK-52E cells. In agreement with our results, other natural compounds obtained from stem barks and roots, such as cinnamaldehyde and apocynin, reduced the glucose production and levels of this gluconeogenic enzyme in the kidney of diabetic animals.^[35,36] Similarly, cocoa, tea, EC, and other flavonoids such as naringenin and resveratrol have been reported to modulate the gluconeogenesis in different cultured cell lines and animal models of diabetes and obesity.^[16,37–40]

An inhibited insulin signaling could lead to an enhanced gluconeogenesis, which could contribute to the hyperglycemia.^[4] The activation of IR-IRS-1 cascade initiates the stimulation of the PI3K/AKT pathway, which is needed for the metabolic effects of insulin and is responsible of the inhibition of GSK-3 and activation of GS. In this regard, EC and DHBA increased tyrosine phosphorylation and total levels of IR and IRS-1, as well as the phosphorylated values of AKT and GSK-3, and decreased p-GS levels in NRK-52E cells. In concert, polyphenols from *Hibiscus sabdariffa* diminished the inhibitory phosphorylated levels of (Ser307)-IRS-1 without modifying the total levels of this protein, as well as increased the values of p-PI3K in insulin-resistant renal proximal tubular cells.^[41] In addition, in the kidney of fructose-fed rats quercetin and rutin restored the phosphorylated levels of IR, p-(Tyr)-IRS-1, and AKT, as well as reduced p-(Ser307)-IRS-1 values, whereas total levels of the mentioned proteins remained unchanged.^[42] Correspondingly, in preadipocytes oligomeric structures of a grape-seed procyanidin extract activated IR by interacting with and inducing its tyrosine phosphorylation.^[43] In this line, a downregulation of IR and GSK3 has been reported in renal proximal tubules of diabetic rats,^[23] and a protective role for GSK3 has been suggested in high glucose-treated renal proximal tubular cells.^[44] Moreover, it has been shown that the SGLT-2-mediated transport involved the phosphorylation of SGLT-2 via IR signaling in HEK-293T cells transfected with SGLT-1 and -2,^[45] and in diabetic patients the administration of empagliflozin (an SGLT-2 inhibitor) improved insulin secretion and peripheral glucose uptake through poorly defined mechanisms.^[46] Indeed, the contribution of the insulin-sensitizing effects to the overall beneficial effect of SGLT-2 inhibitory drugs needs to be examined. Altogether it might indicate that phenolic compounds reinforced the signal pathways responsive to insulin in NRK-52E cultured cells.

Insulin signaling affects the renal gluconeogenesis in the proximal tubule, as mentioned.^[4,24] AKT is a key protein of the insulin signaling pathway that has been suggested to play a role in the repression of PEPCK.^[47] In agreement, here we have shown that AKT is involved in the modulation of PEPCK levels and the production of glucose in NRK-52E cells treated with EC and DHBA. As far as we know, the role of AKT induced by phenolic compounds on PEPCK and glucose production in renal tubular cells has not been studied previously. However, it has been demonstrated that AKT is involved in the inhibition of PEPCK and glucose production in hepatic cells treated with EC and clove

extracts.^[12,48] Additionally, it could be mentioned that some phenolic compounds have already demonstrated to prevent or ameliorate the induced-epithelial-mesenchymal transition in proximal tubular renal cells and in kidneys of diabetic rats,^[41] as well as to contribute to preserve the renal function (including insulin pathway) in fructose-fed rats with renal injury.^[42] Similarly, cocoa and EC have shown beneficial effects in different animal models of diabetes type 2 in different tissues such as liver and adipose tissue. Thus, the administration of a cocoa-rich diet to ZDF rats improved the liver insulin resistance by abolishing the increased p-(Ser)-IRS-1 levels and preventing the inactivation of the GSK3/GS pathway.^[37] The hypoglycemic effect of cocoa also appeared to be mediated through the decreased levels of hepatic PEPCK and by the increased values of glucokinase and GLUT-2. Likewise, an EC-supplemented diet alleviated insulin resistance in the liver and adipose tissue of high-fructose fed rats by preventing partial or total decrease in the activation of key proteins of the insulin signaling pathway (IR, IRS1, AKT, and ERK1/2).^[49]

In summary, EC and DHBA regulate glucose uptake and strengthen the insulin signaling pathway, as they enhanced tyrosine phosphorylation and total levels of IR and IRS-1, and activated the PI3K/AKT pathway. We have also revealed a new mechanism by which EC and DHBA modulate the renal gluconeogenesis and PEPCK expression via AKT in NRK-52E cultured cells. Further efforts are needed to define in detail the precise mechanism of action of EC and its colonic metabolites, such as DHBA, in the regulation of the glucose homeostasis and the insulin pathway in renal proximal tubular cells; especially in vivo studies will be helpful to ensure the potential benefits derived from their consumption in the prevention and/or treatment of type 2 diabetes complications before indicating any recommendation.

Abbreviations

AKT/PKB, protein kinase B; DHBA, 2,3-dihydroxybenzoic acid; DH-PAA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; EC, (-)-epicatechin; FBS, foetal bovine serum; GLUT-2, glucose transporter-2; GS, glycogen synthase; GSK-3, glycogen synthase kinase-3; G6Pase, glucose-6-phosphatase; HPPA, 3-hydroxyphenylpropionic acid; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; SGLT-2, sodium-glucose co-transporter-2; VA, vanillic acid

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgments

This work was supported by the grants AGL2015-67087 (MINECO/FEDER, UE) and AGL2014-58205-REDC from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MINECO). D. Álvarez-Cilleros is a FPI fellow from the predoctoral program of MINECO (BES-2016-076721).

Conflict of Interest

The authors have declared no conflict of interest.

Keywords

epicatechin and colonic metabolites, glucose production, glucose uptake, insulin signaling pathway, NRK-52E cells

Received: May 30, 2017
Revised: November 3, 2017

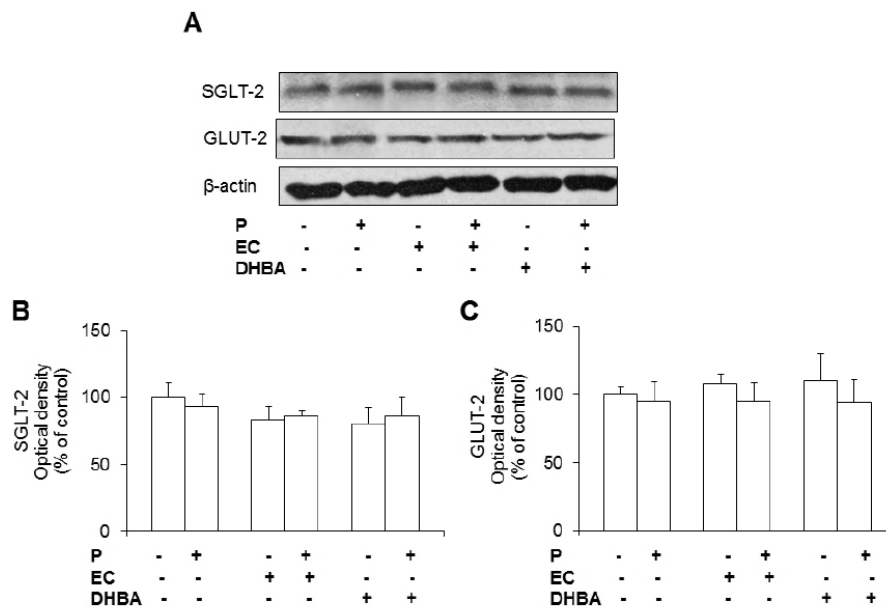
- [1] J. M. Forbes, M. E. Cooper, *Physiol. Rev.* **2013**, 93, 137.
- [2] A. Mitrakou, *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, 93S, S66.
- [3] S. Han, D. L. Hagan, J. R. Taylor, L. Xin, W. Meng, S. A. Biller, J. R. Wetterau, W. N. Washburn, J. M. Whaley, *Diabetes* **2008**, 57, 1723.
- [4] F. Artunc, E. Schleicher, C. Weigert, A. Fritsche, N. Stefan, H. U. Häring, *Nat. Rev. Nephrol.* **2016**, 12, 721.
- [5] H. Rahmoune, P. W. Thompson, J. M. Ward, C. D. Smith, G. Hong, J. Brown, *Diabetes* **2005**, 54, 3247.
- [6] S. Ramos, *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, 52, 507.
- [7] M. A. Martín, L. Goya, S. Ramos, *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, 60, 1756.
- [8] P. V. A. Babu, D. Liu, E. R. Gilbert, *J. Nutr. Biochem.* **2013**, 24, 1777.
- [9] M. Monagas, M. Urpi-Sarda, F. Sanchez-Patan, R. Llorach, I. Garrido, C. Gomez-Cordoves, C. Andres-Lacueva, B. Bartolome, *Food Function* **2010**, 1, 233.
- [10] E. Fernández-Millán, S. Ramos, C. Alvarez, L. Bravo, L. Goya, M. A. Martín, *Food Chem. Toxicol.* **2014**, 66, 245.
- [11] F. Ahmad, P. Khalid, M. M. Khan, A. K. Rastogi, J. R. Kidwai, *Acta Diabetol. Lat.* **1989**, 26, 291.
- [12] I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, L. Bravo, L. Goya, S. Ramos, *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, 57, 974.
- [13] S. D. Quine, P. S. Raghu, *Pharmacol. Rep.* **2005**, 57, 610.
- [14] E. Verzelloni, C. Pellacani, D. Tagliazucchi, S. Tagliaferri, L. Calani, L. G. Costa, F. Brighenti, G. Borges, A. Crozier, A. Conte, D. Del Rio, *Mol. Nutr. Food Res.* **2011**, 55, S35.
- [15] M. A. Vazquez-Prieto, A. Bettaieb, F. G. Haj, C. G. Fraga, P. I. Oteiza, *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, 527, 113.
- [16] I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, L. Goya, S. Ramos, *Food Chem. Toxicol.* **2014**, 64, 10.
- [17] K. Igarashi, K. Honma, O. Yoshinari, F. Nanjo, Y. Hara, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2007**, 53, 496.
- [18] M. J. Kim, G. R. Ryu, J. S. Chung, S. S. Sim, D. S. Min, D. J. Rhie, S. H. Yoon, S. J. Hahn, M. S. Kim, Y. H. Jo, *Pancreas* **2003**, 26, 292.
- [19] I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, L. Goya, S. Ramos, *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, 59, 597.
- [20] A. B. Blodgett, R. K. Kothinti, I. Kamyshko, D. H. Petering, S. Kumar, N. M. Tatabai, *Diabetes Technol. Ther.* **2011**, 13, 743.
- [21] J. Drozak, R. Doroszewska, K. Chodnicka, K. Winiarska, J. Bryla, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, 37, 1269.
- [22] G. Nowak, R. G. Schnellmann, *Am. J. Physiol.* **1995**, 268, C1053.
- [23] R. Gatica, R. Bertinat, P. Silva, D. Carpio, M. J. Ramírez, J. C. Slebe, R. San Martín, F. Nualart, J. M. Campistol, C. Caelles, A. J. Yáñez, *J. Cell Biochem.* **2012**, 114, 639.
- [24] S. Tiwari, R. S. Singh, L. Li, S. Tsukerman, M. Godbole, G. Pandey, C. M. Ecelbarger, *J. Am. Soc. Nephrol.* **2013**, 24, 1209.
- [25] E. L. Whiteman, H. Cho, M. J. Birnbaum, *Trends Endocrinol. Metab.* **2002**, 13, 444.
- [26] L. Marzban, R. Rahimian, R. W. Brownsey, J. H. McNeill, *Endocrinology* **2002**, 143, 4636.
- [27] S. Mudaliar, D. Polidori, B. Zambrowicz, R. R. Henry, *Diabetes Care* **2015**, 38, 2344.
- [28] M. Jiang, Q. Wang, T. Karasawa, J. W. Koo, H. Li, P. S. Steyger, *PLoS One* **2014**, 9, e108941.
- [29] L. Norton, C. Shannon, M. Fourcaudot, C. Hu, N. Wang, W. Ren, J. Song, M. Abdul-Ghani, R. A. DeFronzo, J. Ren, W. Jia, *Diabetes Obes. Metab.* **2017**, 19, 1322.
- [30] J. A. Vinson, J. Proch, P. Bose, S. Muchler, P. Taffera, D. Shutta, N. Samman, G. A. C. Agbor, *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 8071.
- [31] F. Pérez-Vizcaino, D. Bishop-Bailley, F. Lodi, J. Duarte, A. Cogolludo, L. Moreno, L. Boscá, J. Mitchell, T. Warner, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **2006**, 346, 919.
- [32] P. A. Kroon, M. N. Clifford, A. Crozier, A. J. Day, J. L. Donovan, C. Manach, G. Williamson, *Am. J. Clin. Nutr.* **2004**, 80, 15.
- [33] W. Blaschek, *Planta Med.* **2017**, 83, 985.
- [34] U. Panchapakesan, K. Pegg, S. Gross, M. G. Komala, H. Mudaliar, J. Forbes, C. Pollock, A. Mather, *PLoS One* **2013**, 8, e54442.
- [35] P. Anand, K. Y. Murali, V. Tandon, P. S. Murthy, R. Chandra, *Chem. Biol. Interact.* **2010**, 186, 72.
- [36] K. Winiarska, M. Grabowski, M. K. Rogacki, *Chem. Biol. Interact.* **2011**, 189, 119.
- [37] I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, F. Escrivá, C. Álvarez, L. Goya, S. Ramos, *J. Nutr. Biochem.* **2015**, 26, 704.
- [38] G. T. Diaz-Gerevini, G. Repossi, A. Dain, M. C. Tarres, U. N. Das, A. R. Eynard, *Nutrition* **2016**, 32, 174.
- [39] N. A. Nyane, T. B. Tlaila, T. G. Malefane, D. E. Ndwandwe, P. M. O. Owira, *Eur. J. Pharmacol.* **2017**, 803, 103.
- [40] C. S. Yang, J. Zhang, L. Zhang, J. Huang, Y. Wang, *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, 60, 160.
- [41] C.-N. Huang, C.-J. Wang, Y.-S. Yang, C.-L. Lin, C.-H. Peng, *Food Function* **2016**, 7, 475.
- [42] Q.-H. Hu, X. Zhang, Y. Pan, Y.-C. Li, L.-D. Kong, *Biochem. Pharmacol.* **2012**, 84, 113.
- [43] G. Montagut, C. Bladé, M. Blay, J. Fernández-Larrea, G. Pujadas, M. J. Salvadó, L. Arola, M. Pinent, A. Ardévol, *J. Nutr. Biochem.* **2010**, 21, 961.
- [44] M. M. Mariappan, S. Prasad, K. D'Silva, E. Cedillo, K. Sataranatarajan, J. L. Barnes, G. G. Choudhury, B. S. Kasinath, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289, 35363.
- [45] C. Ghezzi, E. M. Wright, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2012**, 303, C348.
- [46] E. Ferrannini, E. Muscelli, S. Frascerra, S. Baldi, A. Mari, T. Heise, U. C. Broedl, H.-J. Woerle, *J. Clin. Invest.* **2014**, 124, 499.
- [47] P. J. Klover, R. A. Mooney, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, 36, 753.
- [48] R. C. Prasad, B. Herzog, B. Boone, L. Sims, M. Waltner-Law, *J. Ethnopharmacol.* **2005**, 96, 295.
- [49] A. Bettaieb, M. A. Vazquez-Prieto, C. Rodriguez-Lanzi, R. M. Miatello, F. G. Haj, C. G. Fraga, P. I. Oteiza, *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, 72, 247.

Resultados – Capítulo primero

Supplementary Table 1. Effects on cell viability of EC, DHBA, DHPAA, HPPA and VA. Cell viability was determined as relative percent of Crystal Violet stained control cells (% of viable cells). Data represent means \pm SD of 8-10 samples. No differences were found after incubating the cells with any treatment in comparison to control cells ($P < 0.05$).

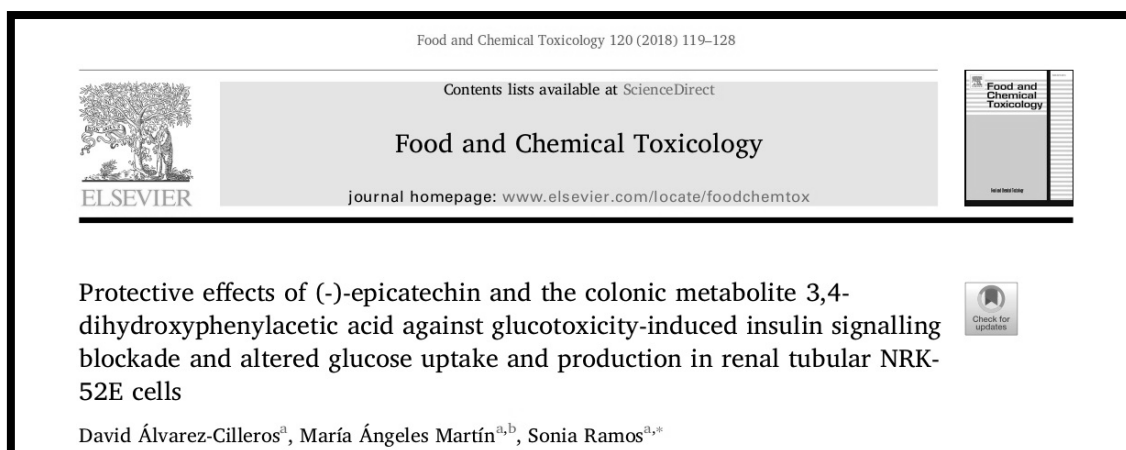
	EC	DHBA	DHPAA	HPPA	VA
C	100.0 \pm 7.1				
μM					
1	91.5 \pm 6.9	104.3 \pm 9.2	105.3 \pm 7.7	107.1 \pm 8.8	105.3 \pm 7.5
5	95.2 \pm 6.8	105.2 \pm 4.0	107.8 \pm 5.9	109.7 \pm 8.8	109.3 \pm 5.6
10	100.0 \pm 8.5	110.6 \pm 10.0	112.0 \pm 7.9	112.3 \pm 7.1	106.9 \pm 8.5
20	104.1 \pm 8.6	109.9 \pm 6.9	106.2 \pm 9.8	109.5 \pm 8.8	101.4 \pm 7.8
40	103.0 \pm 9.3	113.9 \pm 7.5	105.8 \pm 6.8	107.0 \pm 9.9	103.4 \pm 7.9
50	99.0 \pm 7.7	105.9 \pm 9.6	107.2 \pm 6.6	110.7 \pm 5.2	108.0 \pm 8.7
100	97.5 \pm 8.8	108.5 \pm 9.0	105.5 \pm 6.7	106.5 \pm 7.8	108.7 \pm 8.8

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Effect of EC and DHBA and the SGLT-2 inhibitor phlorizin (P) on levels of SGLT-2 and GLUT-2. NRK-52E cells were incubated in the presence or absence of 0.5 mM P for 1 h and later with 10 μ M EC or 20 μ M DHBA. (A) Bands of representative experiments. Densitometric quantification of (B) SGLT-2 levels and (C) GLUT-2. Values are expressed as a percentage relative to the control condition and are means \pm SD, n=6-10. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. No significant differences were found when compared control cells with EC-, DHBA- and P-treated cells ($P < 0.05$).

1.1.2. Artículo II.



La glucotoxicidad que provocan los altos niveles de glucosa es la principal causa en la patogénesis de la diabetes, y también en la DN. En la actualidad no existen tratamientos efectivos para la DN, por ello, el desarrollo de nuevas estrategias es crítico para los pacientes con DN. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la EC y los principales ácidos fenólicos colónicos derivados de la ingesta de flavonoides podrían tener efectos antidiabéticos; sin embargo, los mecanismos a través de los cuales ejercen un efecto protector en la homeostasis glucídica y en la señalización de la insulina en el riñón se desconocen.

El objetivo de este estudio consistió en evaluar la modulación de la homeostasis glucídica y la regulación de la señalización de la insulina por la EC y los ácidos fenólicos colónicos derivados de la ingesta de flavonoides (el DHBA, el DHPAA y el HPPA) en las células renales NRK-52E sometidas a altas dosis de glucosa (30 mM).

Para evaluar el posible efecto protector de la EC (10 μ M) y del DHPAA (10 μ M), las células NRK-52E se pretrataron 2 horas con ambas sustancias naturales y, a continuación, con una alta dosis de glucosa (30 mM, 22 horas). Se analizaron los niveles del GLUT-2 y del SGLT-2, la producción y la captación de glucosa, así como las proteínas claves de la ruta de señalización de la insulina (el IR y la PI3K/AKT), de la gluconeogénesis (la AMPK y la PEPCK) y de la glucogenogénesis (la GSK3 y la GS).

Estos estudios mostraron que el pretratamiento de las células NRK-52E con la EC (10 μ M) y el DHPAA (10 μ M) previno el aumento de la producción y captación de glucosa inducido por la alta concentración de glucosa sin modificar los niveles del GLUT-2 y del SGLT-2. Este efecto protector se anuló cuando se inhibieron la AKT y la AMPK, sugiriendo la participación de ambas proteínas en los procesos anteriores. Además, la EC y el DHPAA fueron capaces de prevenir la disminución de los niveles fosforilados y totales del IR

causados por el tratamiento de las células con altas dosis de glucosa. El pretratamiento con la EC y con el DHPAA también previno la inactivación de la ruta de la PI3K/AKT y de la AMPK, así como el incremento de la expresión de la PEPCK inducido por altas dosis de glucosa.

Estos resultados han permitido concluir que el pretratamiento de las células NRK-52E con la EC y con el DHPAA previene o retrasa una posible disfunción de dichas células tubulares expuestas a altas dosis de glucosa, ya que son capaces de evitar el bloqueo de la señalización de la insulina y contribuir a la modulación de la homeostasis glucídica al regular la vía de la PI3K/AKT y la AMPK.

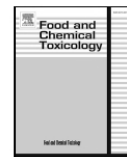
La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por la puesta a punto del modelo *in vitro*, así como por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: la producción de glucosa, la captación de glucosa y el WB. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.



Contents lists available at ScienceDirect

Food and Chemical Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchemtox



Protective effects of (-)-epicatechin and the colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid against glucotoxicity-induced insulin signalling blockade and altered glucose uptake and production in renal tubular NRK-52E cells

David Álvarez-Cilleros^a, María Ángeles Martín^{a,b}, Sonia Ramos^{a,*}

^a Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Colonic-derived flavonoid metabolites
Epicatechin
Glucose homeostasis
Glucotoxicity
Insulin signalling pathway
NRK-52E cells

ABSTRACT

Glucotoxicity (high levels of glucose) is a major cause in the pathogenesis of diabetes. Evidences indicate that (-)-epicatechin (EC) and colonic metabolites derived from flavonoid intake could possess antidiabetic effects, but the mechanisms for their preventive activities related to glucose homeostasis and insulin signalling in the kidney remain largely unknown. This work is aimed to investigate the effect of EC and main colonic phenolic acids derived from flavonoid intake, i.e. 2,3-dihydroxybenzoic-acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic-acid (DHPAA) and 3-hydroxyphenylpropionic-acid, on insulin signalling, and glucose production and uptake in renal tubular proximal NRK-52E cells treated with high glucose. Pre-treatment with EC or DHPAA prevented the decreased tyrosine-phosphorylated and total levels of IR caused by high glucose. EC and DHPAA pre-treatment also avoided the inactivation of the PI3K/AKT pathway and AMPK, and the elevation of PEPCK levels induced by high glucose. Additionally, EC and DHPAA pre-treatment alleviated the altered glucose uptake and production caused by high glucose, although this protective effect was abrogated when AKT and AMPK were inhibited. These results suggest EC and DHPAA prevent or delay a potential dysfunction of NRK-52E cells treated with high glucose through the attenuation of the insulin signalling blockade and the modulation of glucose homeostasis via AKT and AMPK.

1. Introduction

Nephropathy is a major complication of diabetes affecting 15–25% of diabetic patients (Winocour, 2018). This diabetic complication can result in a progressive decline in the renal function, leading to the end-stage renal disease in 30–50% of diabetic patients (Umanath and Lewis, 2018).

During diabetic nephropathy, kidneys undergo several changes, including tubular atrophy (Forbes and Cooper, 2013). Thus, alterations in proximal tubules, which constitute more than 90% of the cortical mass of the kidney, are considered as major determinants for the progression of the renal disease in diabetes (Forbes and Cooper, 2013). In this regard, glucotoxicity (sustained high levels of glucose) is

recognized as a main player in this pathological process (Forbes and Cooper, 2013).

Kidneys importantly contribute to maintain the glucose homeostasis; indeed, the dysregulation of this homeostasis plays a main role in the injury of renal tubular cells, and therefore, in the pathogenesis of the diabetic nephropathy (Forbes and Cooper, 2013). In diabetes the renal glucose uptake increases, and this might be associated to normal or upregulated levels of SGLT-2 and glucose transporter-2 (GLUT-2) levels (Jaikumkao, et al., 2017; Mitrakou, 2011; Norton et al., 2017; Rahmoune et al., 2005). In addition, the renal gluconeogenesis is enhanced because of the deregulation of rate-limiting gluconeogenic enzymes, such as of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), and defects in the insulin pathway are also thought to affect the renal

Abbreviations: AKT/PKB, protein kinase B; AMPK, 5'-AMP-activated protein kinase; DHBA, 2,3-dihydroxybenzoic acid; DHPAA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; EC, (-)-epicatechin; FBS, foetal bovine serum; GLUT, glucose transporter; GS, glycogen synthase; GSK-3, glycogen synthase kinase-3; HPPA, 3-hydroxyphenylpropionic acid; IR, insulin receptor; IRS, insulin receptor substrate; 2-NBDG, 2-deoxy-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino); PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; SGLT-2, sodium-glucose co-transporter-2

* Corresponding author.

E-mail address: s.ramos@ictan.csic.es (S. Ramos).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.003>

Received 25 May 2018; Received in revised form 26 June 2018; Accepted 2 July 2018

Available online 06 July 2018

0278-6915/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

glucose homeostasis (Artunc et al., 2016; Mitrakou, 2011; Rahmoune et al., 2005). All these altered features lead to the maintenance of sustained high levels of glucose and to the tubular injury (Artunc et al., 2016; Mitrakou, 2011; Rahmoune et al., 2005). Therefore, developing effective approaches to reduce the high levels of glucose is of great importance for preventing the progress of the nephropathy in diabetes.

Epidemiological evidence and clinical trials have reported that consumption of cocoa or flavanols, such as (-)-epicatechin (EC) have positive effects against diabetes type 2 (Costa et al., 2017; Kim et al., 2016; Martín et al., 2016, 2017). These antidiabetic effects of EC and cocoa has been related to their ability to improve the insulin sensitivity (Cordero-Herrera et al., 2014, 2015a; Grassi et al., 2008; Kim et al., 2016) and insulin secretion (Fernández-Millán et al., 2014; Kim et al., 2016; Martín et al., 2013), and to reduce blood glucose levels (Cordero-Herrera et al., 2015a; Fernandez-Millan et al., 2015; Grassi et al., 2008; Kim et al., 2016; Uysal et al., 2016; Zengin et al., 2017), among others. However, it should be considered that phenolic compounds are submitted to metabolic processes after food or flavanol intake and that their bioavailability would determine their potential health effects (Blancas-Benitez et al., 2018; Monagas et al., 2010). Consequently, the monomers, which are absorbed in the small intestine, and the different phenolic acids of low molecular weight proceeding from the colonic metabolism, which constitute a very large percentage of the amount ingested, circulate in the body prior to their excretion in urine, and should be considered when evaluating the impact of phenolic compounds on health (Martín et al., 2016; Monagas et al., 2010). In this regard, mono- and di-hydroxylated phenylpropionic and phenylacetic acids have been found as main colonic phenolic acids derived from flavanol intake (Monagas et al., 2010), and, similarly to the monomer EC, exhibit potential health beneficial effects (Alvarez-Cilleros et al., 2018b, 2018c; Fernández-Millán et al., 2014; Kim et al., 2016; Martín et al., 2016; Monagas et al., 2010). However, to the best of our knowledge little is known about the potential beneficial effect of EC and the microbial phenolic metabolites derived from flavanol intake on renal tubular cells during diabetes, and the precise mechanism for their potential preventive activities related to glucose homeostasis, including insulin signalling in the kidney, has not been studied.

This work is aimed to evaluate the protective effects of EC and the colonic-derived flavonoid metabolites 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), and 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA) against a high glucose challenge on crucial modulatory mechanisms related to the glucose homeostasis in renal proximal tubular NRK-52E cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

(-)-EC (> 95% of purity), DHBA ($\geq 99\%$ of purity), DHPAA (> 98% of purity), HPPA (> 98% of purity), D-glucose, Compound C (6-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo [1,5-a]pyrimidine), LY294002 (2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride), and sodium lactate were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). The fluorescent probe D-glucose, 2-deoxy-2-((7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino) (2-NBDG) was from Molecular Probes (Invitrogen, Madrid, Spain). Anti-AKT and anti-phospho-Ser473-AKT detecting levels of total and phospho-AKT, anti-GSK3 α/β and anti-phospho-GSK3 α/β detecting phosphorylated Ser21/9 of GSK3, anti-GS and anti-phospho-GS recognizing phosphorylated Ser641 of GS, as well as anti-AMPK and anti-phospho-Thr172-AMPK, and anti- β -actin were obtained from Cell Signalling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-phospho-IR recognizing levels of phosphorylated Tyr1150/1151 of IR, anti-IR β , anti-PEPCK and anti-SGLT-2 were purchased from Santa Cruz (sc-81500, sc-711, sc-32879 and sc-98975, respectively, Qimigen, Madrid, Spain). Anti-GLUT-2 was from Millipore (Madrid, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis were from BioRad (BioRad Laboratories S.A., Madrid,

Spain). Cell culture dishes, glutamine and cell culture medium were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and Lonza (Madrid, Spain), respectively.

2.2. Cell culture and treatments

Rat NRK-52E cells (kindly provided by Prof. Dr. Patricio Aller, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain) were grown in DMEM medium containing 5.5 mM D-glucose, 2 mM glutamine, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

To evaluate the protective effect of EC, DHBA, DHPAA and HPPA against a high glucose challenge, 1–20 μ M of each compound were added to the cells for 2 h prior to a challenge with 30 mM glucose for 22 h, as previously reported (Alvarez-Cilleros et al., 2018a; Fang et al., 2015; Hou et al., 2014; Zhang et al., 2016). In the experiments with the inhibitors, cells were pre-incubated with 10 μ M CC (Compound C, AMPK inhibitor) or 20 μ M LY (LY294002, AKT specific inhibitor) for 1 h prior to EC or DHPAA (10 μ M) incubation for 2 h followed by the glucose challenge (22 h).

2.3. Glucose uptake

Cellular glucose uptake was quantified by the 2-NBDG assay using a microplate reader. Cells were plated in 24-well plates at a rate of 2×10^5 cells per well and after the treatments, 2-NBDG was added at 10 μ M final concentration and incubated for 1 h at 37 °C. Then, cells were washed twice with PBS, serum-free medium was added and the fluorescence intensity immediately measured in a microplate reader at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm. After being taken by the cells, 2-NBDG was converted to a non-fluorescent derivative (2-NBDG metabolite). A fair estimation of the overall glucose uptake was obtained by quantifying the decrease in the fluorescence. The assay has been described elsewhere (Alvarez-Cilleros et al., 2018b; Blodgett et al., 2011; Cordero-Herrera et al., 2015b).

2.4. Glucose production assay

NRK-52E cells were seeded in 24-well plates (2×10^5 cells per well) and the day of the assay, the medium was then replaced with glucose production buffer consisting of glucose-free DMEM (pH 7.4) without phenol red (Invitrogen, Madrid, Spain), supplemented with 5 mM sodium lactate and 5 mM glutamine, as previously described (Alvarez-Cilleros et al., 2018b; Cordero-Herrera et al., 2013; Drozak et al., 2005; Nowak and Schnellmann, 1995). After a 1.5 h incubation, medium was collected and glucose concentration measured with a colorimetric glucose assay kit (Sigma, Madrid, Spain). The readings were then normalized to the total protein content determined from the whole-cell lysates.

2.5. Preparation of cell lysates

Cells were lysed at 4 °C in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, 200 mM β -glycerolphosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 2 μ g/mL leupeptin and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. The supernatants were collected, assayed for protein concentration by using the Bio-Rad (Bio-Rad, Madrid, Spain) protein assay kit according to the manufacture's specifications, aliquoted and stored at –80 °C until used for immunoprecipitation and/or Western blot analyses.

2.6. Western blot analysis

Equal amounts of proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride filters (Bio-Rad, Madrid, Spain). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-

conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, Madrid, Spain) or anti-mouse (Sigma, Madrid, Spain) immunoglobulin. Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Normalization of Western blot was ensured by β -actin and bands were quantified using a scanner and accompanying software.

2.7. Statistics

Prior to statistical analysis, data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene. For multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by the Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. $P < 0.05$ was considered significant. An SPSS version 23.0 program has been used.

3. Results

3.1. Effects of EC and colonic phenolic metabolites on glucose uptake and production

Glucose uptake and production contribute to the maintenance of the glucose homeostasis, which is critical to prevent the damage in renal proximal tubular cells induced by high concentrations of glucose (Artunc et al., 2016; Mitrakou, 2011; Rahmoune et al., 2005). To study whether the exposure of renal tubular cells to EC or colonic phenolic metabolites can protect against the dysregulation induced by a high dose of glucose on glucose uptake and glucose production, both parameters were assayed. NRK-52E cells were pre-incubated for 2 h with realistic doses of EC, DHBA, DHPAA or HPPA (1–20 μ M) prior to 22 h of 30 mM glucose (HG) treatment.

As shown in Table 1, treatment of cells with glucose alone increased both glucose production and uptake (as indicated in the later by the decrease in the percentage of 2-NBDG uptake). Pre-incubation of NRK-52E cells with 5–20 μ M EC or 10–20 μ M DHPAA restored the enhanced glucose uptake to control levels, and 10–20 μ M EC or 10 μ M DHPAA reversed the glucose-induced production of glucose to pre-stress values. DHBA and HPPA did not show any protective effect against HG-induced

glucose uptake or production. Then, for subsequent experiments 10 μ M EC and 10 μ M DHPAA were selected, as these doses comprised the lowest concentrations of both compounds showing a protective effect on both glucose uptake and production. Moreover, the range of concentrations selected for the study did not damage cell integrity during the period of incubation, as previously shown (Álvarez-Cilleros et al., 2018b).

3.2. EC and DHPAA prevent high glucose-induced downregulation of tyrosine phosphorylated and total levels of IR

For maintaining the glucose homeostasis is also crucial the correct modulation of the insulin signalling, and IR constitutes the first step for recruiting and activating downstream pathways (Artunc et al., 2016; Gatica et al., 2012; Tiwari et al., 2013). Then, to evaluate the effect of EC and DHPAA on tyrosine phosphorylation and total levels of IR, NRK-52E cells were exposed for 2 h to 10 μ M EC or DHPAA followed by a 22 h-incubation with 30 mM glucose.

EC or DHPAA pre-treatment totally restrained the decrease in both tyrosine phosphorylated and total levels of IR values induced by the high dose of glucose, showing comparable levels to those of cells treated with EC or DHPAA alone (Fig. 1). These results suggest that EC and DHPAA could avert the blockage of the insulin signalling cascade induced by a high dose of glucose through the modulation of the early steps of this pathway.

3.3. EC and DHPAA maintain AKT, and restrain downregulation of GSK3, and upregulation of GS phosphorylation induced by high glucose

Following with the insulin pathway, AKT stimulation leads to the inhibition of glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) by phosphorylation, which subsequently phosphorylates and inactivates glycogen synthase (GS) (Nystrom and Quon, 1999). To evaluate the potential protective effect of EC and DHPAA against a high glucose challenge, cells were pre-treated with the phenolic compounds (10 μ M, 2 h), incubated with a high glucose concentration (30 mM, 22 h), and phosphorylated and total levels of AKT, GSK3 and GS were analysed by Western blot analysis.

Treatment of NRK-52E cells with a high dose of glucose increased the phosphorylated levels of AKT and GS, and it decreased p-GSK3 values (Fig. 2). EC or DHPAA alone evoked an enhancement in the phosphorylated levels of AKT and GSK3, whereas both compounds diminished p-GS values (Fig. 2). Likewise, pre-treatment with EC or DHPAA maintained the enhancement in p-AKT values, showing comparable levels to those of cells treated with EC or DHPAA alone (Fig. 2A and B). Accordingly, both compounds averted the diminution in the p-GSK3 levels and reverted the enhanced p-GS values induced by the high dose of glucose to similar levels of those of untreated cells (Fig. 2A, C and 2D). There was no difference in the total values of AKT, GSK3 and GS. All these results suggest that EC and DHPAA restrained the inhibition of the PI3K/AKT pathway, which is a key route in the insulin signalling cascade.

3.4. EC and DHPAA prevent high glucose-induced downregulation on AMPK phosphorylation and upregulation on PEPCK

AMPK constitutes a central regulator of the cellular metabolism, and PEPCK is one of the major enzymes responsible for the regulation of gluconeogenesis (Huang et al., 2013; Marzban et al., 2002; Rotte et al., 2010); then to continue the study of the potential protective effect of EC and DHPAA, total values of PEPCK, and both total and phosphorylated levels of AMPK were evaluated by Western blot.

As Fig. 3A and B illustrate, 22 h-treatment with 30 mM glucose decreased p-AMPK values, whereas EC or DHPAA alone induced an increase in the phosphorylated levels of AMPK. The diminution in the p-AMPK values induced by the high glucose challenge was counteracted

Table 1

Protective effect on glucose uptake and glucose production of EC, DHBA, DHPAA and HPPA calculated as percentage relative to control values. NRK-52E cells incubated with the phenolic compounds for 2 h were exposed to 30 mM glucose (HG) for additional 22 h. Data are means \pm SD of 8–12 different samples per condition. Means without a common letter in the same column for each phenolic compound differ ($P < 0.05$).

	2-NBDG uptake (% of controls)	Glucose production (% of controls)
C	100.4 \pm 3.1 ^a	100.9 \pm 6.9 ^a
HG	73.2 \pm 8.8 ^b	225.9 \pm 10.6 ^b
EC + HG		
1 μ M	80.6 \pm 9.26 ^b	183.5 \pm 10.4 ^c
5 μ M	94.3 \pm 9.8 ^a	132.0 \pm 13.31 ^d
10 μ M	94.2 \pm 8.3 ^a	99.5 \pm 9.9 ^a
20 μ M	98.3 \pm 5.5 ^a	98.1 \pm 8.4 ^a
DHBA + HG		
1 μ M	79.9 \pm 4.9 ^b	246.3 \pm 21.3 ^b
5 μ M	77.2 \pm 8.3 ^b	215.3 \pm 12.1 ^b
10 μ M	77.7 \pm 7.3 ^b	234.4 \pm 11.1 ^b
20 μ M	76.2 \pm 7.8 ^b	252.4 \pm 23.0 ^b
DHPAA + HG		
1 μ M	78.0 \pm 5.3 ^b	219.6 \pm 19.3 ^b
5 μ M	83.1 \pm 5.8 ^b	175.6 \pm 13.3 ^c
10 μ M	92.4 \pm 8.4 ^a	113.7 \pm 8.6 ^a
20 μ M	92.1 \pm 5.6 ^a	133.2 \pm 13.9 ^d
HPPA + HG		
1 μ M	76.3 \pm 2.3 ^b	212.6 \pm 14.8 ^b
5 μ M	74.7 \pm 9.9 ^b	195.2 \pm 19.0 ^b
10 μ M	81.0 \pm 5.1 ^b	205.9 \pm 12.1 ^b
20 μ M	89.0 \pm 5.3 ^b	213.0 \pm 15.5 ^b

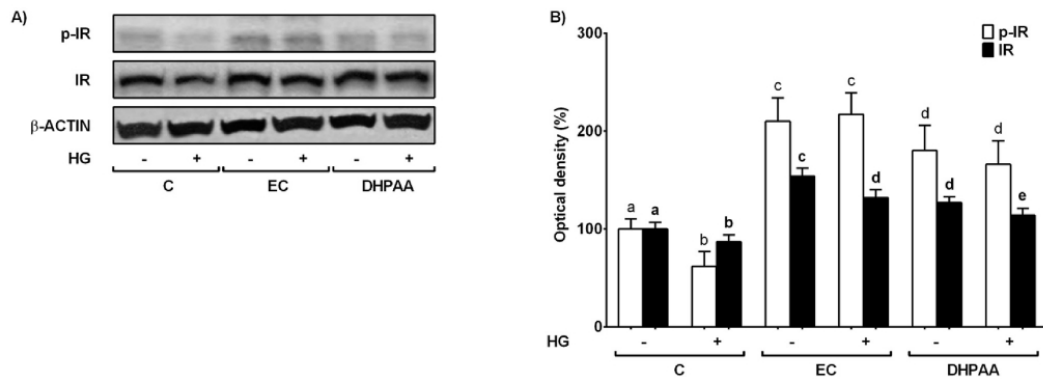


Fig. 1. Protective effect of EC and DHPAA on the decreased phosphorylated and total levels of IR induced by 30 mM glucose. NRK-52E cells incubated with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA for 2 h were exposed to 30 mM glucose (HG) for additional 22 h. (A) Bands of representative experiments. Densitometric quantification of (B) p-IR and total IR. Values are expressed as a percentage relative to the control condition (means \pm SD, $n = 7-9$). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Means (for the phosphorylated or total protein levels) without a common letter differ ($P < 0.05$).

by the EC and DHPAA pre-treatment, and showed comparable levels to those of untreated cells. Protein levels of total AMPK were not modified by any treatment. In addition, treatment of NRK-52E cells with EC or

DHPAA alone led to a comparable decrease in the expression of PEPCK (Fig. 3A and C). Incubation with a high dose of glucose increased the levels of PEPCK, but this was totally suppressed in cells previously

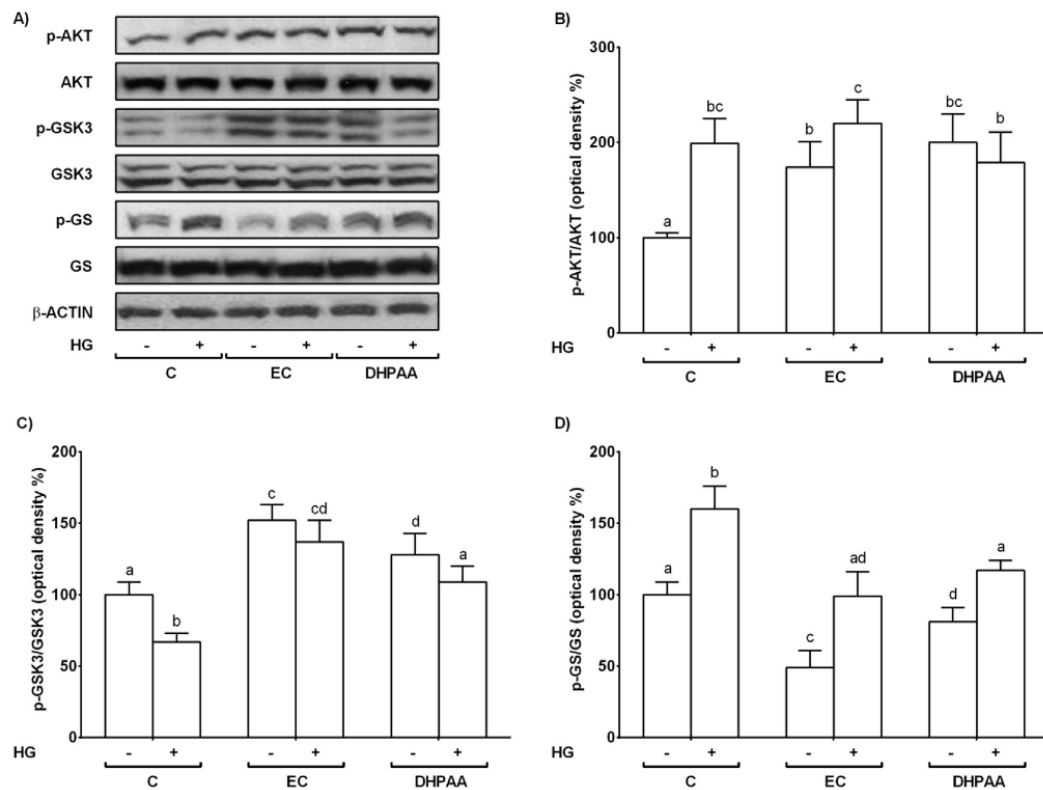


Fig. 2. Effect of EC and DHPAA on the enhanced phosphorylated and total levels of AKT, and GS, and on the decreased levels of phosphorylated and total GSK3 induced by 30 mM glucose in NRK-52E cells. Cells treated with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA for 2 h were later incubated with 30 mM glucose (HG) for 22 h. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of (B) p-AKT/AKT, (C) p-GSK3/GSK3 and (D) p-GS/GS ratios relative to controls. Values are expressed as means \pm SD, $n = 7-9$. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ ($P < 0.05$).

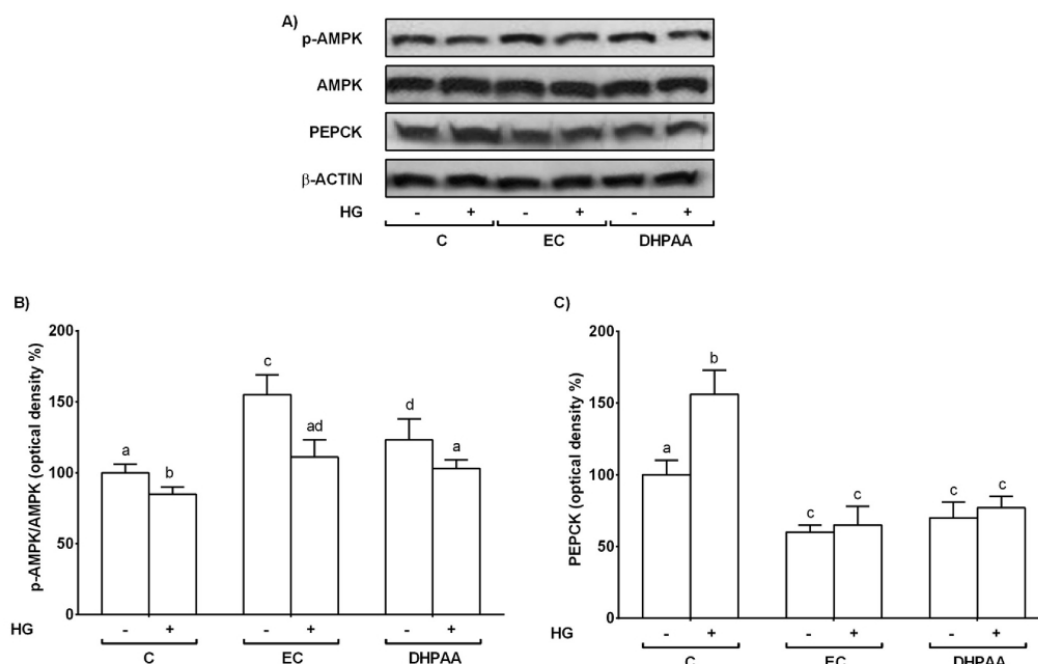


Fig. 3. Protective effect of EC and DHPAA on the diminished phosphorylated and total AMPK levels, and on the elevated levels of PEPCK evoked by 30 mM glucose in NRK-52E cells. Cells treated with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA for 2 h were exposed to 30 mM glucose (HG) for 22 h. (A) Bands of representative experiments. (B) Percent values of p-AMPK/AMPK ratio and (C) PEPCK data relative to the control condition. Values are expressed as means \pm SD, n = 6–9. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Different letters over bars indicate statistically significant differences ($P < 0.05$).

treated with EC or DHPAA, achieving comparable levels to those of cells treated with EC or DHPAA alone. This is in agreement with the fact that the enhancement in glucose production was prevented by EC and DHPAA (10 μ M) in high glucose-challenged cells. Altogether these results suggested that EC and DHPAA might contribute to preserve renal tubular functionality and modulate the glucose homeostasis.

3.5. EC, DHPAA and high glucose do not modify SGLT-2 and GLUT-2 levels

SGLT-2 and GLUT-2 are involved in the renal glucose homeostasis (Artunc et al., 2016; Mitroukou, 2011; Rahmoune et al., 2005), and we have shown that glucose uptake was modulated by EC and DHPAA in NRK-52E cells (Table 1). To evaluate the potential effect of EC and DHPAA on these transporters under high glucose conditions, NRK-52E cells were incubated with the phenolic compounds for 2 h, treated with 30 mM glucose for additional 22 h, and then SGLT-2 and GLUT-2 levels were evaluated.

Treatment of NRK-52E cells with EC or DHPAA alone did not affect the expression levels of SGLT-2 and GLUT-2 (Fig. 4). Similar results were obtained when cells were incubated with 30 mM glucose alone for 22 h or when cells were previously treated with EC or DHPAA and later submitted to the high glucose challenge.

3.6. Effect of EC and DHPAA activation of AKT on glucose uptake and gluconeogenesis

In the renal cortex it has been suggested that the insulin pathway regulates the glucose transport and that AKT inhibits PEPCK (Alvarez-Cilleros et al., 2018b; Ghezzi and Wright, 2012; Marzban et al., 2002). To analyse whether EC or DHPAA were able to modulate the expression of PEPCK, and both glucose production and uptake via AKT, NRK-52E

cells were exposed to a selective inhibitor of AKT (LY294002) for 1 h followed by a 2 h-incubation with EC or DHPAA prior to the high glucose challenge (22 h).

As Fig. 5A and C illustrate, EC and DHPAA pre-treatment prevented both the increase of PEPCK levels and glucose production induced by the high glucose challenge (Fig. 5A and C). Under high glucose conditions, the incubation with LY294002 suppressed the decrease of PEPCK levels induced by the EC or DHPAA pre-incubation, and displayed similar levels to those of high glucose-challenged cells. Additionally, in EC- or DHPAA-pre-treated cells the inhibition of AKT enhanced the glucose production, showing higher values than those of high glucose-treated cells.

As described above, EC and DHPAA pre-treatment prevented the enhanced glucose uptake induced by 30 mM glucose (Fig. 5D). Inhibition of AKT abolished the protective effect on the glucose uptake induced by EC- and DHPAA, displaying comparable values to those of 30 mM glucose-incubated cells. Altogether these results point to the relevance of AKT on the improved glucose uptake and production, as well as on PEPCK levels induced by EC and DHPAA after a high glucose challenge in renal tubular cells.

3.7. Effect of EC and DHPAA activation of AMPK on glucose uptake and gluconeogenesis

AMPK is a known suppressor of gluconeogenesis and modulator of glucose transport in renal cells (Rotte et al., 2010). To examine the role of AMPK on the regulatory effects induced by EC and DHPAA on PEPCK levels, and on both glucose uptake and production, AMPK was blocked by a selective chemical inhibitor (Compound C, 1 h) prior to the treatment with 10 μ M EC or DHPAA (2 h) followed by a high glucose challenge (30 mM, 22 h).

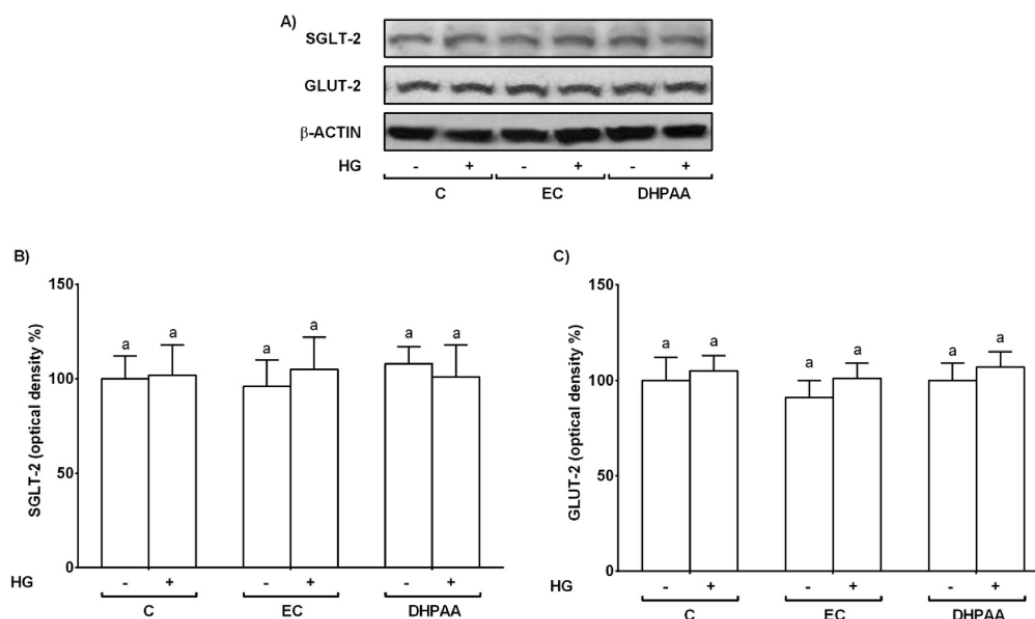


Fig. 4. Effect of EC and DHPAA on SGLT-2 and GLUT-2 levels in high glucose-challenged NRK-52E cells. Cells incubated with 10 μM EC or 10 μM DHPAA for 2 h were exposed to 30 mM glucose (HG) for additional 22 h. (A) Bands of representative experiments. Densitometric quantification of (B) SGLT-2 and (C) GLUT-2. Values are expressed as a percentage relative to the untreated control condition and are means \pm SD, $n = 6-8$ ($P < 0.05$). Means without a common letter differ. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin.

EC and DHPAA pre-incubation avoided both the alteration in PEPCK levels and in glucose production induced by the high glucose concentration (Fig. 5A and C). Besides, under high glucose conditions, the inhibition of AMPK in cells pre-treated with EC or DHPAA enhanced PEPCK levels and glucose production, evoking in both cases higher values than those of high glucose-challenged cells. In addition, the enhanced glucose uptake induced by 30 mM glucose was averted when NRK-52E cells were previously incubated with EC or DHPAA (Fig. 6D). However, the inhibition of AMPK in high glucose-challenged cells pre-incubated with EC or DHPAA reduced the glucose uptake (Fig. 6D). These results suggest the involvement of AMPK in EC- and DHPAA-induced modulation of glucose uptake and gluconeogenesis.

4. Discussion

The flavanol (-)-epicatechin (EC) belongs to an important group of natural phenolic compounds, which seems to possess anti-diabetic properties (Kim et al., 2016; Martín et al., 2016, 2017; Uysal et al., 2016; Zengin et al., 2017). However, it is becoming more clear that the impact of phenolic compounds on health not only depends on food polyphenols but also on their metabolites derived from the dietary intake, comprising those metabolites generated during the colonic fermentation a large percentage of the amount ingested (Blancas-Benitez et al., 2018; Monagas et al., 2010). In the present study, for the first time it is demonstrated that EC and DHPAA attenuate the insulin signalling blockade induced by a high dose of glucose through the prevention of the decrease in tyrosine phosphorylated and total IR levels, and the inhibition of PI3K/AKT and AMPK pathways. Furthermore, it is shown that EC and DHPAA protect NRK-52E functionality against the high glucose challenge by modulating glucose production and uptake via AKT and AMPK.

As mentioned above, after flavanol intake the main urinary microbial phenolic acids are mono- and di-hydroxylated phenylpropionic and

phenylacetic acids, together with hydroxybenzoic acids (Monagas et al., 2010), although pure compounds are also accumulated in tissues as a consequence of a conjugation-deconjugation cycle (Pérez-Vizcaino et al., 2006). Therefore, in the present study EC and three of the most abundant phenolic compounds found in urine after the intake of flavanol-rich foods have been selected to evaluate their protective effect against a high glucose challenge. In addition, it should be mentioned that a realistic range of concentrations of phenolic compounds (1–20 μM) has been selected to perform the work, as these levels are considered to be within the range recommended for *in vitro* studies and they could be found in biological fluids after the intake of flavanols (Monagas et al., 2010). Thus, to resemble the diabetic situation a widely employed *in vitro* model has been used, which consists in incubating the renal tubular cells with a high concentration of glucose (30 mM) (Alvarez-Cilleros et al., 2018a; Fang et al., 2015; Hou et al., 2014; Zhang et al., 2016). In these experimental conditions, alterations in the redox balance, inflammatory response, and in the PI3K/AKT pathway, among others, have been reported, similar to the diabetic situation (Alvarez-Cilleros et al., 2018a; Fang et al., 2015; Hou et al., 2014; Zhang et al., 2016).

In the diabetic nephropathy an early pathophysiological alteration that correlates with the decline of the renal function is the tubular dysfunction, and it has been associated to the glucotoxicity, i.e. sustained high levels of glucose (Forbes and Cooper, 2013; Mollica et al., 2017). Interestingly, kidneys contribute to the glucose homeostasis via gluconeogenesis, glucose uptake from the circulation, glucose recovery from the urine, and recently a role for the insulin signalling has also been suggested in renal cells (Mitrakou, 2011; Tiwari et al., 2013). In this line, the inactivation of IR initiates the inhibition of the insulin pathway, which is responsible of the activation of GSK-3 and inhibition of GS (Nystrom and Quon, 1999). Consistent with this, our results showed that a high concentration of glucose led to decreased tyrosine phosphorylated and total levels of IR in renal proximal tubular NRK-

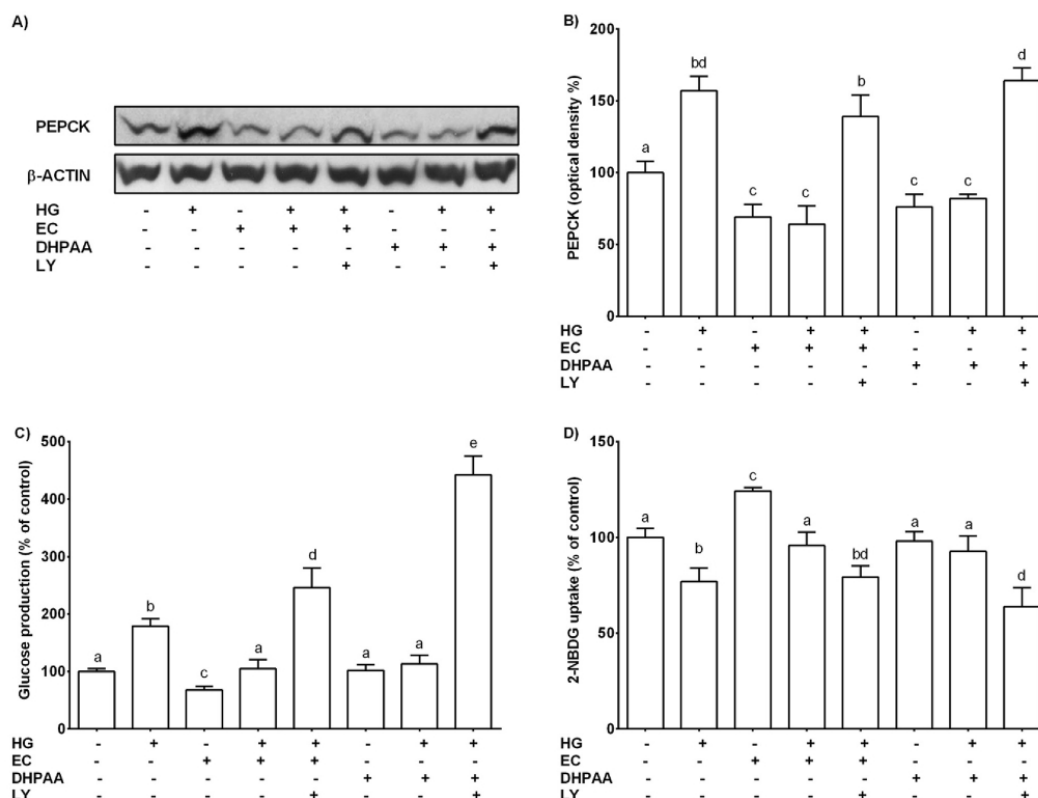


Fig. 5. Effect of EC and DHPAA and the selective inhibitor LY (LY294002) on levels of PEPCK, and glucose uptake and production. NRK-52E cells were incubated in the presence or absence of 20 μ M LY for 1 h and later with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA for 2 h followed by a 22 h-incubation with 30 mM glucose (HG). (A) Bands of representative experiments. (B) Percentage data of PEPCK levels relative to the control condition (means \pm SD, n = 7–9). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. (C) Glucose production expressed as percent of control are means \pm SD of 9–12 different samples per condition. (D) Glucose uptake expressed as percent of control are means \pm SD of 8–10 different samples per condition. Means without a common letter differ ($P < 0.05$).

52E cells, although this effect was prevented by EC and DHPAA pre-treatment. Indeed, similar alterations have been reported to occur in renal cells under high glucose conditions in rats (Gatica et al., 2012; Tiwari et al., 2007). In agreement with our results, other natural compounds such as quercetin and rutin restored p-(Tyr)-IR levels in the kidney of insulin-resistant rats (Hu et al., 2012). In addition, previous studies have recently shown that EC and DHBA alone increased p-(Tyr)-IR and IR values in NRK-52E cells (Alvarez-Cilleros et al., 2018b). Similarly, Montagut et al., 2010 have reported that oligomeric structures of a grape-seed procyanidin extract activated IR by interacting with and inducing its tyrosine phosphorylation in preadipocytes.

Downregulation of IR and GSK3, and upregulation of AKT have been reported in high glucose-exposed renal cells, in agreement with our results (Gatica et al., 2012; Hao et al., 2011; Lee and Han, 2010; Zhang et al., 2016). However, this inhibitory effect was abolished when cells were previously treated with EC or DHPAA. Different natural compounds have shown to reactivate the insulin pathway under high glucose conditions; thus, polyphenols from *Hibiscus sabdariffa* increased the values of p-PI3K in insulin-resistant renal proximal tubular cells (Huang et al., 2016), and quercetin and rutin also enhanced the expression levels of PI3K/AKT in the kidney of insulin-resistant rats (Hu et al., 2012). Moreover, it should be mentioned that despite that the high glucose challenge activated AKT, this increment of p-AKT values was accompanied by decreased levels of p-GSK3 and enhanced values of

p-GS, pointing to the blockage of the insulin pathway. Indeed, in renal tubular cells exposed to high glucose an increase in p-AKT levels has already been reported, and this has been connected to dysfunctions in lipid metabolism, extracellular matrix accumulation and oxidative stress (Hao et al., 2011; Lee and Han, 2010). Conversely, increased levels of GSK3 have been associated to a protective role in high glucose-treated renal proximal tubular cells (Mariappan et al., 2014). Interestingly, it has been reported that a long-sustained hyperglycaemia might result in the accumulation of glycogen in the renal proximal tubules of diabetic rats, although this detrimental effect was reversed by administering a green tea extract to the diabetic animals (Renno et al., 2008). In this line, it should be highlighted that cells pre-treated with EC or DHPAA presented increased levels of p-AKT and p-GSK3 together with diminished values of p-GS, which indicates that under high glucose conditions phenolic compounds might improve the cell functionality.

AMPK is an intracellular energy sensor implicated in the regulation of cellular metabolism; indeed, AMPK is inhibited in diabetes and seems to be responsible for the initiation of the renal disease (Lee et al., 2007). We have demonstrated that EC and DHPAA alone increased the phosphorylated levels of AMPK, and prevented the decrease evoked by the high glucose exposure in renal tubular cells. In this line, natural plant compounds such as resveratrol and zerumbone contribute to restore the diminished p-AMPK levels, and consequently, to improve the cellular metabolism, in the kidney of diabetic rats and in high glucose-

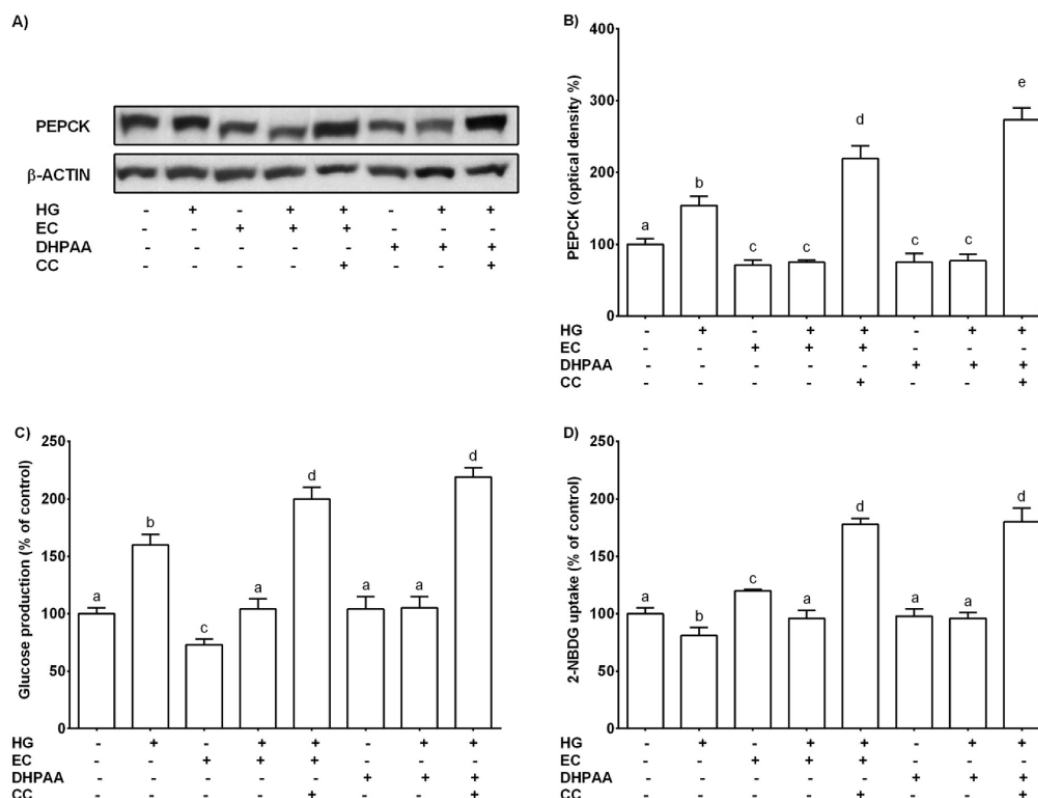


Fig. 6. Effect of EC and DHPAA and the selective inhibitor CC (Compound C) on levels of PEPCK, and glucose uptake and production. NRK-52E cells were incubated in the presence or absence of 10 μ M CC for 1 h and later with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA for 2 h followed by a 22 h-incubation with 30 mM glucose (HG). (A) Bands of representative experiments. (B) Percentage data of PEPCK levels relative to the control condition (means \pm SD, n = 6–9). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. (C) Glucose production expressed as percent of control are means \pm SD of 8–12 different samples per condition. (D) Glucose uptake expressed as percent of control are means \pm SD of 8–10 different samples per condition. Means without a common letter differ ($P < 0.05$).

incubated renal tubular cells, respectively (Chang et al., 2011; Shrikanth and Chilkunda, 2017). Similarly, oligonol, a depolymerized flavanol derived from lychee fruit, and green tea lowered glycaemia, and reversed the reduced phosphorylated levels of AMPK in the kidney of diabetic mice (Liu et al., 2016). Therefore, under high glucose conditions AMPK reactivation could be associated to improved glucose homeostasis in the kidney (Chang et al., 2011; Liu et al., 2016; Shrikanth and Chilkunda, 2017).

PEPCK is one of the main enzymes involved in the regulation of gluconeogenesis, which mainly occurs in the renal proximal tubular cells (Artunc et al., 2016; Mitrakou, 2011); thus, during diabetes PEPCK increases in the kidney (Gatica et al., 2012). We have previously demonstrated that EC and the colonic metabolite DHBA decreased PEPCK levels in NRK-52E cells (Alvarez-Cilleros et al., 2018b). In the present work, EC and DHPAA completely prevented the high glucose-induced enhancement of PEPCK values. Accordingly, other natural compounds such as cinnamaldehyde and apocynin, diminished the levels of this gluconeogenic enzyme in the liver of diabetic animals (Anand et al., 2010; Huang et al., 2013; Winiarska et al., 2011).

In the kidney, glucose reabsorption across the proximal tubule involves SGLT-mediated transport and GLUT-2-facilitated transport (Mittrakou, 2011; Rahmoune et al., 2005). In the present study, levels of SGLT-2 and GLUT-2 were not altered by the high glucose challenge or the phenolic compound treatments. Accordingly, unmodified levels of

both transporters have been reported during diabetes or after phenolic compound incubation in renal cells (Alvarez-Cilleros et al., 2018b; Jaikumkao et al., 2017; Norton et al., 2017); indeed, it has been suggested that the alteration in GLUT-2 and SGLT-2 levels is related to the values of glycaemia and the duration of diabetes (Jaikumkao et al., 2017; Norton et al., 2017).

AKT and AMPK are key proteins that are dysregulated during diabetic nephropathy, and that under physiological conditions are main responsible of modulating signalling pathways related to the cellular energy (Lee et al., 2007; Rotte et al., 2010). In this line, it has been suggested that both proteins are involved in the modulation of the glucose homeostasis in the kidney (Alvarez-Cilleros et al., 2018b; Rotte et al., 2010), although the links are not very well defined yet. In agreement with this, the blockage of AKT abolished the protective effects exerted by EC and DHPAA under high glucose conditions, i. e. PEPCK levels, as well as both glucose production and uptake were enhanced in renal tubular cells. To the best of our knowledge, the role of AKT induction evoked by flavanols or their metabolites on gluconeogenesis and glucose transport in renal tubular cells under high glucose conditions has not been previously studied. However, we have recently demonstrated that AKT is involved in the modulation of PEPCK and glucose production in renal tubular cells treated with EC and the colonic metabolite DHBA (Alvarez-Cilleros et al., 2018b). Additionally, AKT has demonstrated to play an important role in the restoration of

the altered SGLT functions in high glucose-treated renal tubular cells (Lee and Han, 2010). Altogether it might indicate that EC and DHPAA by regulating AKT contribute to the modulation of the glucose homeostasis in renal tubular cells.

As mentioned above, AMPK also seems to be involved in the modulation of glucose homeostasis. Correspondingly, the present results demonstrated for the first time that EC and DHPAA prevented the high glucose-induced alteration in glucose homeostasis via AMPK. This is supported by our findings that the inhibition of AMPK abrogated the protective effects evoked by EC- and DHPAA, i.e. PEPCK levels and glucose production were enhanced, and glucose uptake was decreased in NRK-52E cells. In agreement with this, it has been reported that AMPK activators enhance the cellular glucose uptake by increasing the activity of glucose transporters (Lieberthal et al., 2016; Rotte et al., 2010). Additionally, after the administration of the anti-diabetic drug metformin, which activates AMPK, reduced expression levels of PEPCK were observed in the kidney of chicken, pointing to an association between AMPK and the mentioned rate-limiting gluconeogenic PEPCK enzyme (Sato et al., 2011), as shown in the present work. As far as we know, the role of AMPK induced by phenolic compounds on the glucose homeostasis in renal tubular cells has not been studied previously. However, it has been demonstrated that cocoa, tea, EC, and other flavonoids such as naringenin and resveratrol modulate the levels of PEPCK and gluconeogenesis in different cultured cell lines and animal models of diabetes (Cordero-Herrera et al., 2014, 2015a; Diaz-Gerevini et al., 2016; Huang et al., 2013; Nyane et al., 2017). All these features suggested that AMPK regulates key proteins to modulate the homeostasis of glucose and that EC and DHPAA contribute to the regulation of AMPK and the maintenance of the glucose homeostasis in renal tubular cells.

Interestingly, sustained high levels of glucose stimulates sodium transporter, and this retention in the proximal tubule is associated with preserved expression of AKT phosphorylation, and reduced IRS-1 expression (Artunc et al., 2016), which is in agreement with our results. Moreover, reduced IRS-1 expression has been suggested as responsible for the disinhibition of gluconeogenesis and reduced NO production (Artunc et al., 2016). In addition, it should be mentioned that SGLT-2 inhibitors suppress cotransporters of sodium and glucose reabsorption at the renal proximal tubular cells; thus, SGLT-2 transporter inhibition decreased sodium reabsorption, increasing urinary sodium excretion (Artunc et al., 2016). However, other transporters or channels at the proximal tubule could be activated within few days, recovering sodium reabsorption. Thus, sodium reabsorption can continue despite SGLT-2 inhibitor administration (Mima, 2018). In contrast, SGLT-2 inhibitors decrease glucose reabsorption, but there is no compensatory mechanism of glucose reabsorption in the tubules. Thus, glucose acts as a non-reabsorbable component of the proximal tubular fluid, gradually decreasing the relative concentrations of sodium and chloride. In addition, recent studies have shown that high concentrations of glucose inhibits the Na⁺-H⁺ exchanger 3 (NHE3) and that the inhibition of SGLT-2 with the natural compound phlorizin may block the NHE3 in the proximal tubule, showing that SGLT-2 and NHE3 can be functionally related (Pessoa et al., 2014). This mechanism may also play a role in SGLT2 inhibitor-induced natriuretic and diuretic effects. These subjects deserve further studies.

In summary, EC and DHPAA alleviate the renal tubular cell injury caused by a high glucose challenge, as they enhanced tyrosine phosphorylation and total levels of IR, and activated PI3K/AKT pathway and AMPK. In addition, EC and the colonic flavanol metabolite DHPAA preserve the renal tubular cell functionality by contributing to the maintenance of the glucose homeostasis (modulation of glucose uptake and production) through a new mechanism that involved AKT and AMPK. Despite further experiments are needed to define in detail the molecular mechanism of EC and DHPAA in the regulation of the insulin pathway, and in the glucose uptake and production in renal proximal tubular cells, these results provide new evidence about the potential

beneficial effects of the flavanol EC and the colonic metabolite DHPAA on renal tubular functionality.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the grant AGL2015-67087-R (MINECO/FEDER, UE) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MINECO). D. Álvarez-Cilleros is a FPI fellow from the predoctoral program of MINECO (BES-2016-076721).

Transparency document

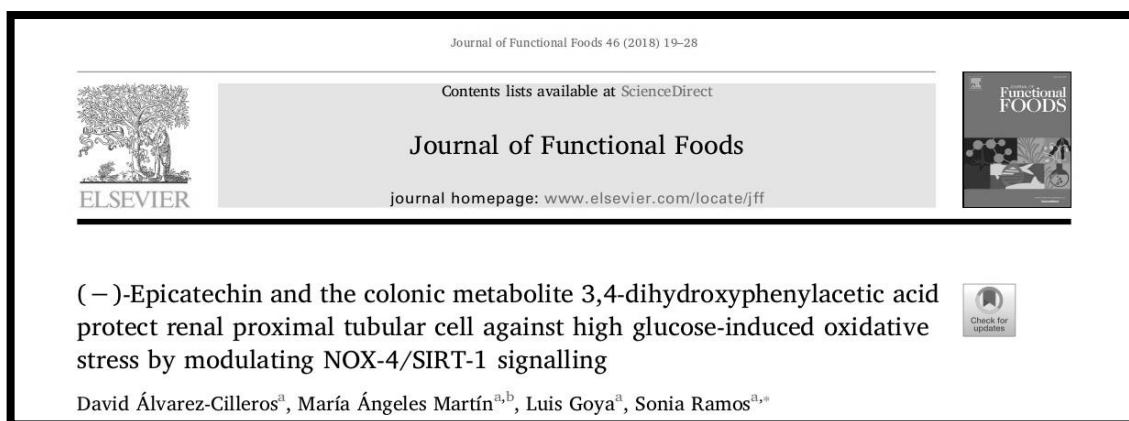
Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.003>.

References

- Alvarez-Cilleros, D., Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2018a. (–)-Epicatechin and the colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid protect renal proximal tubular cell against high glucose-induced oxidative stress by modulating NOX-4/SIRT-1 signalling. *J. Funct. Food* 46, 19–28.
- Alvarez-Cilleros, D., Martín, M.A., Ramos, S., 2018b. (–)-Epicatechin and the colonic 2,3-dihydroxybenzoic acid metabolite regulate glucose uptake, glucose production, and improve insulin signaling in renal NRK-52E cells. *Mol. Nutr. Food Res.* <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700470>.
- Alvarez-Cilleros, D., Ramos, S., Goya, L., Martín, M.A., 2018c. Colonic metabolites from flavanols stimulate nitric oxide production in human endothelial cells and protect against oxidative stress-induced toxicity and endothelial dysfunction. *Food Chem. Toxicol.* 115, 88–97.
- Anand, P., Murali, K.Y., Tandon, V., Murthy, P.S., Chandra, R., 2010. Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 186, 72–81.
- Artunc, F., Schleicher, E., Weigert, C., Fritsche, A., Stefan, N., Häring, H.U., 2016. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 721–737.
- Blancas-Benitez, F.J., Pérez-Jiménez, J., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G.A., Sávyago-Ayerdi, S.G., 2018. In vitro evaluation of the kinetics of the release of phenolic compounds from guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *J. Funct. Food* 43, 139–145.
- Blodgett, A.B., Kothinti, R.K., Kamysko, I., Petering, D.H., Kumar, S., Tabatabai, N.M., 2011. A fluorescence method for measurement of glucose transport in kidney cells. *Diabetes Technol. Ther.* 13, 743–751.
- Chang, C.-C., Chang, C.-Y., Wu, Y.-T., Huang, J.-P., Yen, T.-H., Hung, L.-M., 2011. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *J. Biomed. Sci.* 18, 47.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Bravo, L., Goya, L., Ramos, S., 2013. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via AKT and AMPK in HepG2 cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 974–985.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Escrivá, F., Álvarez, C., Goya, L., Ramos, S., 2015a. Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr. Biochem.* 26, 704–712.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2014. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 64, 10–19.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2015b. Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high glucose-induced oxidative stress. Relevance of MAPKs. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 597–609.
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Caruso, E., Tsoukalas, D., Margina, D., Dardiotis, E., Kouretas, D., Fenga, C., 2017. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food Chem. Toxicol.* 110, 286–299.
- Diaz-Gerevini, G.T., Repossi, G., Dain, A., Tarres, M.C., Das, U.N., Eynard, A.R., 2016. Beneficial action of resveratrol: how and why? *Nutrition* 32, 174–178.
- Drozak, J., Doroszewska, R., Chodnicka, K., Winiarska, K., Bryla, J., 2005. Contribution of L-3,4-dihydroxyphenylalanine metabolism to the inhibition of gluconeogenesis in rabbit kidney-cortex tubules. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1269–1280.
- Fang, Q., Zhao, L., Wang, Y., Zhang, Y., Li, Z., Pan, Y., Kanchana, K., Wang, J., Tong, C., Li, D., Liang, G., 2015. A novel chalcone derivative attenuates the diabetes-induced renal injury via inhibition of high glucose-mediated inflammatory response and macrophage infiltration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 282, 129–138.
- Fernandez-Millan, E., Cordero-Herrera, I., Escrivá, F., Ramos-Romero, S., Álvarez, C., Goya, L., Martín, M.A., 2015. Cocoa-rich diet attenuates beta cell mass loss and function in young Zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress and beta cell apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 820–824.

- Fernández-Millán, E., Ramos, S., Alvarez, C., Bravo, L., Goya, L., Martín, M.A., 2014. Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butylhydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food Chem. Toxicol.* 66, 245–253.
- Forbes, J.M., Cooper, M.E., 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* 93, 137–188.
- Gatica, R., Bertinat, R., Silva, P., Carpio, D., Ramírez, M.J., Slebe, J.C., San Martín, R., Nualart, F., Campistol, J.M., Caelles, C., Yáñez, A.J., 2012. Altered expression and localization of the insulin receptor in proximal tubule cells from human and rat diabetic kidney. *J. Cell. Biochem.* 114, 639–649.
- Ghezzi, C., Wright, E.M., 2012. Regulation of the human Na⁺-dependent glucose co-transporter hSGLT2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303, C348–C354.
- Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., Blumberg, J.B., Ferri, C., 2008. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J. Nutr.* 138, 1671–1676.
- Hao, J., Liu, S., Zhao, S., Liu, Q., Lv, X., Chen, H., Niu, Y., Duan, H., 2011. PI3K/Akt pathway mediates high glucose-induced lipogenesis and extracellular matrix accumulation in HKC cells through regulation of SREBP-1 and TGF- β 1. *Histochem. Cell Biol.* 135, 173–181.
- Hou, S., Zheng, F., Li, Y., Gao, L., Zhang, J., 2014. The protective effect of glycyrrhizic acid on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose. *Int. J. Mol. Sci.* 15, 15026–15043.
- Hu, Q.-H., Zhang, X., Pan, Y., Li, Y.-C., Kong, L.-D., 2012. Allopurinol, quercetin and rutin ameliorate renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation in fructose-fed rats. *Biochem. Pharmacol.* 84, 113–125.
- Huang, C.-N., Wang, C.-J., Yang, Y.-S., Lin, C.-L., Peng, C.-H., 2016. Hibiscus sabdariffa polyphenols prevent palmitate-induced renal epithelial mesenchymal transition by alleviating dipeptidyl peptidase-4-mediated insulin resistance. *Food & Function* 7, 475–482.
- Huang, P.L., Chi, C.W., Liu, T.Y., 2013. Areca nut procyanidins ameliorate streptozotocin-induced hyperglycemia by regulating gluconeogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 55, 137–143.
- Jaikumkao, K., Pongchaidecha, A., Chatsudthipong, V., Chattipakorn, S.C., Chattipakorn, N., Lungkaphin, A., 2017. The roles of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in preventing kidney injury in diabetes. *Biomed. Pharmacother.* 94, 176–187.
- Kim, Y., Keogh, J.B., Clifton, P.M., 2016. Polyphenols and glycemic control. *Nutrients* 8, 17.
- Lee, M.-J., Feliars, D., Mariappan, M.M., Sataranatarajan, K., Mahaimanathan, L., Musi, N., Foretz, M., B. V., Weinberg, J.M., Choudhury, G.G., Kasinath, B.S., 2007. A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 292, F617–F627.
- Lee, Y.J., Han, H.J., 2010. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3 β , Snail1, and β -catenin in renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 298, F1263–F1275.
- Lieberthal, W., Tang, M., Lusco, M., Abate, M., Levine, J.S., 2016. Preconditioning mice with activators of AMPK ameliorates ischemic acute kidney injury in vivo. *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.* 311, F731–F739.
- Liu, H.-W., Wei, C.-C., Chang, S.-J., 2016. Low-molecular-weight polyphenols protect kidney damage through suppressing NF- κ B and modulating mitochondrial biogenesis in diabetic db/db mice. *Food & Function* 7, 1941–1949.
- Mariappan, M.M., Prasad, S., D'Silva, K., Cedillo, E., Sataranatarajan, K., Barnes, J.L., Choudhury, G.G., Kasinath, B.S., 2014. Activation of glycogen synthase kinase 3 β ameliorates diabetes-induced kidney injury. *J. Biol. Chem.* 289, 35363–35375.
- Martín, M.A., Fernández-Millán, E., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L., 2013. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 447–456.
- Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2016. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 1756–1769.
- Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2017. Protective effects of tea, red wine and cocoa in diabetes. Evidences from human studies. *Food Chem. Toxicol.* 109, 302–314.
- Marzban, L., Rahimian, R., Brownsey, R.W., McNeill, J.H., 2002. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium(IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats *in vivo*. *Endocrinology* 143, 4636–4645.
- Mima, A., 2018. Renal protection by sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors and its underlying mechanisms in diabetic kidney disease. *J. Diabetes Complicat.* 32, 720–725.
- Mitrakou, A., 2011. Kidney: its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93S, S66–S72.
- Mollica, A., Zengin, G., Locatelli, M., Stefanucci, A., Macedonio, G., Bellagamba, G., Onaolapo, O., Onaolapo, A., Azeez, F., Ayileka, A., Novellino, E., 2017. An assessment of the nutraceutical potential of *Juglans regia* L. leaf powder in diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 107, 554–564.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., Andres-Lacueva, C., Bartolome, B., 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function* 1, 233–253.
- Montagut, G., Onnockx, S., Vaqué, M., Bladé, C., Blay, M., Fernández-Larrea, J.M., Pujadas, G., Salvadó, M.J., Arola, L., Pirson, I., Ardévol, A., Pinet, M., 2010. Oligomers of grape-seed procyanidin extract activate the insulin receptor and key targets of the insulin signaling pathway differently from insulin. *J. Nutr. Biochem.* 21, 476–481.
- Norton, L., Shannon, C., Fourcaudot, M., Hu, C., Wang, N., Ren, W., Song, J., Abdul-Ghani, M., DeFronzo, R.A., Ren, J., Jia, W., 2017. Sodium-glucose (SGLT) and glucose (GLUT) transporter expression in the kidney of type 2 diabetic subjects. *Diabetes Obes. Metabol.* <https://doi.org/10.1111/dom.13003>.
- Nowak, G., Schnellmann, R.G., 1995. Improved culture conditions stimulate gluconeogenesis in primary cultures of renal proximal tubule cells. *Am. J. Physiol.* 268, C1053–C1061.
- Nyane, N.A., Tlaila, T.B., Malefane, T.G., Ndawandwe, D.E., Owira, P.M.O., 2017. Metformin-like antidiabetic, cardio-protective and non-glycemic effects of naringenin: molecular and pharmacological insights. *Eur. J. Pharmacol.* 803, 103–111.
- Nystrom, F.H., Quon, M.J., 1999. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell. Signal.* 11, 563–574.
- Pérez-Vizcaino, F., Bishop-Bailey, D., Lodi, F., Duarte, J., Cogolludo, A., Moreno, L., Bosca, L., Mitchell, J., Warner, T., 2006. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 346, 919–925.
- Pessoa, T.D., Gastalho-Campos, L.C., Carraro-Lacroix, L., Girardi, A.C.C., Malnic, G., 2014. Functional role of glucose metabolism, osmotic stress, and sodium-glucose cotransporter isoform-mediated transport on Na⁺/H⁺ exchanger isoform 3 activity in the renal proximal tubule. *Am. J. Soc. Nephrol.* 25, 2028–2039.
- Rahmoune, H., Thompson, P.W., Ward, J.M., Smith, C.D., Hong, G., Brown, J., 2005. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 54, 3247–3254.
- Renno, W.M., Abdeen, S., Alkhalaf, M., Asfar, S., 2008. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *Br. J. Nutr.* 100, 652–659.
- Rotte, A., Pasham, V., Eichenmüller, M., Bhandaru, M., Föller, M., Lang, F., 2010. Upregulation of Na⁺/H⁺ exchanger by the AMP-activated protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 398, 677–682.
- Sato, T., Toyoshima, A., Hiraki, T., Ohta, Y., Katayama, K., Arai, T., Tazaki, H., 2011. Effects of metformin on plasma concentrations of glucose and mannose, G6Pase and PEPCK activity, and mRNA expression in the liver and kidney of chickens. *Br. Poultry Sci.* 52, 273–277.
- Shrikanth, C.B., Chilkunda, N.D., 2017. Zerumbone ameliorates high glucose-induced reduction in AMP-activated protein kinase phosphorylation in tubular kidney cells. *J. Agric. Food Chem.* 65, 9208–9216.
- Tiwari, S., Halagappa, V.K., Riaz, S., Hu, X., Ecelbarger, C.A., 2007. Reduced expression of insulin receptors in the kidneys of insulin-resistant rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2661–2671.
- Tiwari, S., Singh, R.S., Li, L., Tsukerman, S., Godbole, M., Pandey, G., Ecelbarger, C.M., 2013. Deletion of the insulin receptor in the proximal tubule promotes hyperglycemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24, 1209–1214.
- Umanath, K., Lewis, J.B., 2018. Update on diabetic nephropathy: core Curriculum 2018. *Am. J. Kidney Dis.* 71, 884–895.
- Uysal, A., Zengin, G., Mollica, A., Gunes, E., Locatelli, M., Turgut, Y., Aktumsek, A., 2016. Chemical and biological insights on *Cotoneaster integriramus*: a new (-)-epicatechin source for food and medicinal applications. *Phytomedicine* 23, 979–988.
- Winiarski, K., Grabowski, M., Rogacki, M.K., 2011. Inhibition of renal gluconeogenesis contributes to hypoglycaemic action of NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Chem. Biol. Interact.* 189, 119–126.
- Winocour, P.H., 2018. Diabetes and chronic kidney disease: an increasingly common multi-morbid disease in need of a paradigm shift in care. *Diabetic Med.* 35, 300–305.
- Zengin, G., Uysal, A., Aktumsek, A., Mocan, A., Mollica, A., Locatelli, M., Custodio, L., Neng, N.R., Nogueira, J.M.F., Aumeeruddy-Elalfi, Z., Fawzi-Mahmoodally, M., 2017. Euphorbia denticulata Lam.: a promising source of phyto-pharmaceuticals for the development of novel functional formulations. *Biomed. Pharmacother.* 87, 27–36.
- Zhang, X., Liang, D., Lian, X., Jiang, Y., He, H., Liang, W., Zhao, Y., Chi, Z.H., 2016. Berberine activates Nrf2 nuclear translocation and inhibits apoptosis induced by high glucose in renal tubular epithelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Apoptosis* 21, 721–736.

1.1.3. Artículo III.



El estrés oxidativo juega un papel fundamental en la patogénesis de la DN. Por su parte, los compuestos fenólicos, como la EC, poseen actividad antioxidante, pero también parecen tener otros efectos beneficiosos para la salud, como propiedades antidiabéticas. Por tanto, estos compuestos fenólicos pueden ser buenos candidatos para modular rutas relacionadas con el estrés oxidativo y proteger a las células tubulares del riñón durante la DN.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la EC y de los ácidos fenólicos colónicos derivados de la ingesta de los flavonoides (el DHBA, el DHPAA y el HPPA) sobre el estado oxidativo en las células NRK-52E sometidas a altas dosis de glucosa (30 mM). Para analizar el posible efecto protector, las células se expusieron durante 2 horas a diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos (1-20 μ M) y, a continuación, con una alta dosis de glucosa (30 mM, 22 horas). Posteriormente, se evaluaron los niveles de los ROS y de las principales defensas antioxidantes (el GSH, la GPx, la GR, la SOD y la CAT), así como proteínas clave relacionadas con el estrés oxidativo (las MAPKs, la SIRT-1 y la NOX-4).

Los resultados obtenidos mostraron que el pretratamiento de las células NRK-52E con la EC (10 μ M) y el DHPAA (10 μ M) protegió frente al aumento de los ROS provocado por la incubación de las células con altas concentraciones de glucosa. Además, el pretratamiento de las células con ambos compuestos fenólicos previno el descenso de los niveles de las defensas antioxidantes y de la SIRT-1, así como el aumento de la expresión de los valores fosforilados y totales de las MAPKs (las ERKs, las JNKs y la p38) y de la NOX-4 causados por las condiciones de altas dosis de glucosa. Asimismo, el uso de inhibidores específicos de la SIRT-1 y de la NOX-4 mostró la participación de ambas proteínas en el efecto protector de los compuestos fenólicos frente al desequilibrio redox producido por las altas concentraciones de glucosa.

Todas estas evidencias experimentales han permitido concluir que el tratamiento de las células NRK-52E con la EC y con el DHPAA protege del estrés oxidativo generado en las células por la alta concentración de glucosa mediante la modulación de diferentes vías de señalización, jugando un papel clave en dicha regulación la SIRT-1 y la NOX-4.

La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por la puesta a punto del modelo in vitro, así como por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: la producción de los ROS, el contenido del GSH, la actividad de las enzimas antioxidantes y el Western blot. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Functional Foods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jff



(–)-Epicatechin and the colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid protect renal proximal tubular cell against high glucose-induced oxidative stress by modulating NOX-4/SIRT-1 signalling

David Álvarez-Cilleros^a, María Ángeles Martín^{a,b}, Luis Goya^a, Sonia Ramos^{a,*}

^a Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Antioxidant defences
Colonic-derived flavonoid metabolites
Epicatechin
NRK-52E cells
Oxidative injury
Signalling pathways

ABSTRACT

Oxidative stress plays a main role in the pathogenesis of the diabetic nephropathy. The present study investigated the effect of (–)-epicatechin (EC) and the colonic-derived flavonoid metabolites 2,3-dihydroxybenzoic acid, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), and 3-hydroxyphenylpropionic acid on the redox status in high-glucose-exposed renal proximal tubular NRK-52E cells. EC and DHPAA (10 μ M) alleviated the redox imbalance induced in high-glucose-challenged cells, as both compounds reverted to control levels reactive oxygen species (ROS) values. EC and DHPAA pre-treatment prevented the decrease of antioxidant defences and silent information regulator protein-1 (SIRT-1), and the increase of phosphorylated mitogen-activated-protein-kinases and NADPH-oxidase-4 (NOX-4) values under high-glucose-conditions. The presence of selective NOX-4 and SIRT-1 inhibitors in EC- and DHPAA-pre-treated cells showed the involvement of both proteins in EC- and DHPAA-mediated protection. These findings suggest that EC and DHPAA protected NRK-52E cells against a high-glucose-challenge by improving the cellular redox status through multiple signalling pathways, playing NOX-4/SIRT-1 a relevant role.

1. Introduction

Diabetes is a complex metabolic disorder characterized by hyperglycaemia that continues increasing worldwide in association with its complications, such as diabetic nephropathy (Forbes & Cooper, 2013; Stanton, 2011). It is widely accepted that persistent oxidative stress is a key player in the development and progression of diabetes and its complications, which are accompanied by increased production of free radicals and/or impaired antioxidant defences (Stanton, 2011).

In response to an excess of reactive oxygen species (ROS) production mammals have evolved different antioxidant defence mechanisms that include glutathione (GSH), and the enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT), among others (Martín & Ramos, 2016). During the generation of ROS superoxide, which is the primary reactive oxygen intermediate, it is rapidly converted to H₂O₂ by spontaneous dismutation and by SOD-catalysed dismutation. Then, H₂O₂ is transformed to

water either by CAT or GPx, which utilizes reduced glutathione produced by GR (Martín & Ramos, 2016). In addition, superoxide reacts with the nitrogen-containing oxidant, nitric oxide, to form highly reactive nitrogen species.

In the diabetic nephropathy it has been suggested that the mitochondrial generation of superoxide and NADPH oxidases (NOX)-derived ROS play a significant role in injuring the kidney (Sedeek et al., 2012; Stanton, 2011). Moreover, a number of cellular kinases, including the mitogen-activated protein kinases (MAPKs), are also modulated by oxidative stress (Cordero-Herrera, Martín, Goya, & Ramos, 2015a; Granado-Serrano, Martín, Goya, Bravo, & Ramos, 2009; Granado-Serrano et al., 2007; Martín et al., 2010), and silent information regulator protein-1 (SIRT-1), which is the most studied member of sirtuins family, links the cellular redox state to multiple signalling and survival pathways (Hao & Haase, 2010). Accordingly, targeting the modulation of the cellular antioxidant defences and close-related key proteins might constitute an effective approach to prevent the development and/

Abbreviations: CAT, catalase; DHBA, 2,3-dihydroxybenzoic acid; DHPAA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DPI, diphenyleneiodonium; EC, (–)-epicatechin; ERK, extracellular-regulated kinase; FBS, foetal bovine serum; GPx, glutathione peroxidase; GR, glutathione reductase; GSH, glutathione; HPPA, 3-hydroxyphenylpropionic acid; JNK, c-jun amino-terminal kinase; MAPKs, mitogen-activated protein kinases; NOX, NADPH oxidases; SIRT-1, silent information regulator protein-1; SOD, superoxide dismutase; t-BOOH, *tert*-butylhydroperoxide

* Corresponding author.

E-mail address: s.ramos@ictan.csic.es (S. Ramos).

<https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.04.051>

Received 27 February 2018; Received in revised form 17 April 2018; Accepted 24 April 2018

Available online 26 April 2018

1756-4646/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

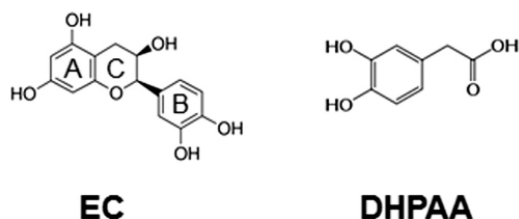


Fig. 1. Chemical structure of (–)-epicatechin (EC) and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA).

or progression of the diabetic nephropathy.

Flavanols, such as (–)-epicatechin (EC), are a group of phenolic compounds and their chemical structure consists of two aromatic rings (A and B) linked through three carbons that forms an oxygenated heterocycle (C ring) (Fig. 1). Flavanols, including EC, are abundantly present in cocoa, tea, grapes, and other fruits and vegetables and it has been reported that more than 80% of flavanols ingested in the diet are metabolized by the colonic microbiota generating several phenolic metabolites (Monagas et al., 2010; Ottaviani et al., 2016). In this line, at the first steps in the catabolism of flavanols the C-ring is opened, which is followed by other reactions to generate hydroxyphenylvalerolactones and valeric acids (Monagas et al., 2010). Then, these compounds are oxidised and produce hydroxyphenylpropionic acids, and later dihydroxyphenylacetic acids. The last steps of the catabolism of flavanols involve dihydroxylation of 3,4-dihydroxylated phenolic acids to generate 3- and 4-monohydroxylated phenolic acids (Monagas et al., 2010).

EC has proved antioxidant activity, but also seems to possess other potential health beneficial effects, such as antidiabetic properties (Giacometti, Muhvic, Pavletic, & Đudarić, 2016; Martín, Goya, & Ramos, 2016; Shahidi & Ambigaipalan, 2015), anticarcinogenic activity (Granado-Serrano et al., 2007), and improves parameters related to the endothelium and inflammation in cardiovascular disease and diabetes (Barnett et al., 2015; Loke et al., 2008; Martín et al., 2016; Ottaviani et al., 2016). In addition, the microbial metabolites derived from the colonic fermentation of cocoa flavanols could play an important role in the prevention of diabetic complications (Álvarez-Cilleros, Martín, & Ramos, 2018; Fernández-Millán et al., 2014). In this line, it has been shown that EC and some colonic phenolic metabolites modulate the oxidative/antioxidative potential and protect their functionality in insulin-sensitive tissues (Cordero-Herrera et al., 2015a; Fernández-Millán et al., 2014; Granado-Serrano et al., 2007; Quine & Raghu, 2005; Ramiro-Puig et al., 2009). Importantly, administration of EC has been reported to cause mild or none adverse effects, although more studies are needed to clearly state the safety of this flavanol (Barnett et al., 2015; Ottaviani et al., 2016). Besides, the precise mechanism for the preventive activities of EC and the microbial phenolic metabolites derived from the flavanol intake related to oxidative stress during diabetes in the renal tubular cells remains largely unknown.

The aim of this study was to evaluate under high glucose conditions the potential protective effects of EC and the colonic-derived flavonoid metabolites 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), and 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA) on the redox status in renal proximal tubular NRK-52E cells.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

(–)-EC (> 95% of purity), DHBA (≥99% of purity), DHPAA (> 98% of purity), HPPA (> 98% of purity), D-glucose, diphenyleneiodonium (DPI), 6-chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide (EX-527, EX), GR, GSH, glutathione oxidized, NADPH, *tert*-

butylhydroperoxide (*t*-BOOH), *o*-phthalaldehyde (OPT) and dichlorofluorescein (DCFH) were purchased from Sigma Chemicals (Madrid, Spain). Anti-ERK1/2 and antiphospho-ERK1/2 recognizing phosphorylated Thr202/Thy204 of ERK1/2, anti-JNK1/2 and antiphospho-JNK1/2 recognizing phosphorylated Thr183/Tyr185 of JNK1/2, antiphospho-Thr180/Tyr182-p38, and anti-β-actin were obtained from Cell Signalling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-p38α (sc-535), anti-NOX-4 (sc-30141), and anti-SIRT-1 (sc-74465) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Qimigen, Madrid, Spain). Bradford reagent, and materials and chemicals for electrophoresis were from BioRad Laboratories S.A. (Madrid, Spain). Cell culture dishes and cell culture medium were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and Cultek (Madrid, Spain), respectively.

2.2. Cell culture and treatments

Rat NRK-52E cells (kindly provided by Prof. Dr. Patricio Aller, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain) were grown in DMEM medium containing 5.5 mM D-glucose, 2 mM glutamine, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS). Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂.

Cells were treated with different concentrations of EC, DHBA, DHPAA or HPPA (1–20 μM) diluted in serum-free culture medium with 5.5 mM D-glucose and 2 mM glutamine during 24 h.

To evaluate the protective effect of EC, DHBA, DHPAA and HPPA against a high glucose challenge, 1–10 μM of each compound were added to the cells for 2 h. Then, cells were submitted to a challenge with 30 mM glucose for 22 h, as previously reported (Fang et al., 2015; Hou, Zheng, Li, Gao, & Zhang, 2014; Yong et al., 2013; Zhang, Miao, Wang, & Zhang, 2013). In the experiments with the inhibitors, cells were pre-incubated with 10 μM DPI (NADH oxidase inhibitor) or 10 μM EX (SIRT-1 specific inhibitor) for 1 h prior to EC or DHPAA incubation for 2 h followed by the glucose challenge.

2.3. Determination of ROS production

Intracellular ROS were quantified by the DCFH assay (Cordero-Herrera et al., 2015a; Granado-Serrano et al., 2007). After being oxidized by intracellular oxidants, DCFH becomes dichlorofluorescein (DCF) and emits fluorescence. Briefly, cells were cultured in 24-well plates (2 × 10⁵ cells per well) and incubated with the different treatments. Then, 5 μM DCFH probe was added to for 30 min at 37 °C. The unabsorbed probe was removed, medium with the different treatments added and fluorescence immediately measured in a microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT) at 485 nm/530 nm (excitation/emission wavelengths, respectively).

2.4. Analysis of GSH content

GSH was quantified by Hissin and Hilf fluorimetric assay (Hissin & Hilf, 1976). The method is based on the reaction of GSH with OPT at pH 8.0 and fluorescence was measured at excitation wavelength of 340 nm and emission wavelength of 460 nm. The results of samples were referred to those of a standard curve of GSH.

2.5. Determination of GPx, GR, CAT and SOD activities

Determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using *t*-BOOH as a substrate, coupled to the disappearance of NADPH by GR (Cordero-Herrera et al., 2015a; Cordero-Herrera, Martín, Goya, & Ramos, 2015b). GR activity was assayed by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADPH utilized in the reduction of oxidized glutathione (Cordero-Herrera et al., 2015a, 2015b). CAT activity was determined by the decomposition of H₂O₂ as a decrease in absorbance at 240 nm (Cordero-Herrera et al., 2015a, 2015b).

SOD activity was assayed by using a commercial kit following the manufacturer's instructions (Sigma) (Cordero-Herrera et al., 2015b). The assay is based on the capacity of SOD to reduce superoxide anion, couple with the disappearance of Dojindo's highly water-soluble tetrazolium salt (WST-1) to yield a dye. SOD activity was quantified by measuring the decrease in the absorbance at 440 nm. Protein concentration was measured by the Bradford reagent (Bradford, 1976).

2.6. Preparation of total cell lysates and Western blot analysis

To detect ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38, SIRT-1 and NOX-4, cells were lysed at 4 °C in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.1% Triton X-100, 200 mM β-glycerolphosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 2 μg/mL leupeptin and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF). Supernatants were collected, assayed for protein concentration by using the Bradford reagent, aliquoted and stored at -80 °C until used for Western blot analyses.

Equal amounts of proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride filters (Merck, Madrid, Spain). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare) or anti-mouse (Sigma) immunoglobulin. Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare). Normalization of Western blot was ensured by β-actin and band quantification was carried out with a scanner and the Scion Image software.

2.7. Statistics

Prior to statistical analysis, data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene. For multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by the Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. $P < 0.05$ was considered significant. An SPSS version 23.0 program has been used.

3. Results

3.1. Effects of EC and colonic phenolic metabolites on ROS generation

To discard that the exposure of renal tubular cells to EC or colonic phenolic metabolites can induce oxidative stress and enhance ROS generation, NRK-52E cells were incubated with realistic doses of EC, DHBA, DHPAA or HPPA (1–20 μM) for 24 h.

As shown in Table 1, treatment of cells with EC alone decreased dose-dependently the production of ROS (10–20 μM), and all microbial metabolites tested maintained levels of ROS in control values. Moreover, the range of concentrations selected for the study did not damage cell integrity during the period of incubation (Álvarez-Cilleros et al., 2018).

Next, to evaluate the long-term protective effect of EC and the colonic phenolic metabolites selected on NRK-52E cultured cells submitted to oxidative stress, cells were pre-treated for 2 h with EC, DHBA, DHPAA or HPPA (1–20 μM) prior to 22 h of 30 mM glucose treatment; then, ROS generation was assayed. Pre-treatment of NRK-52E cells with DHBA or HPPA did not prevent high-glucose-induced ROS generation, whereas 5–20 μM EC or DHPAA reversed the glucose-induced ROS production to pre-stress values (Table 1), showing an IC₅₀ of 3.6 μM and 4.4 μM for EC and DHPAA, respectively. Therefore, the lowest and realistic range of concentrations for both compounds that showed a protective effect against ROS generation, that is 5–10 μM EC and DHPAA, was selected for further studies.

3.2. Effects of EC and DHPAA on antioxidant defences

To continue the study of the protective effect of EC and DHPAA against a high-glucose challenge, cells were pre-treated with both natural substances, incubated with a high glucose concentration (30 mM), and levels of GSH, and activities of GPx, GR, SOD and CAT were evaluated. As shown in Fig. 2, EC and DHPAA alone (5 and 10 μM) did not alter the GSH content or any enzymatic activity tested, just EC (10 μM) alone increased GPx activity when compared to control cells. In addition, incubation of cells with the high dose of glucose (30 mM) diminished all antioxidant defences assayed, as decreased GSH content and activities of GPx, GR, CAT and SOD (Fig. 2).

Under high glucose conditions, pre-treatment of NRK-52E cells with 5 and 10 μM EC or 10 μM DHPAA partially prevented GSH depletion, showing cells pre-treated with 10 μM EC higher GSH levels than 5 μM EC and 10 μM DHPAA; in addition, the mentioned concentrations of EC (5 and 10 μM) and DHPAA (10 μM) completely reversed the glucose-induced inhibition of GPx and GR activities to pre-stress values (Fig. 2A and B). In line with this, pre-treatment with the highest concentration of EC and DHPAA (10 μM) restored CAT and SOD activities to control levels (Fig. 2C and D). These results indicate that 10 μM EC and DHPAA protect NRK-52E cells against the redox imbalance caused by the high glucose concentration, therefore, this was the dose selected for both compounds in subsequent experiments.

3.3. Effects of EC and DHPAA on MAPKs protein levels

MAPKs are regulated by oxidative stress and induced by high doses of glucose (Cordero-Herrera et al., 2015a). Then, cells were pre-treated for 2 h with 10 μM EC or 10 μM DHPAA prior to 22 h of 30 mM glucose treatment, and levels of MAPKs were evaluated.

As shown in Fig. 3, 30 mM glucose increased the phosphorylated levels of all three MAPKs (p-ERK, p-JNK and p-p38). EC and DHPAA alone did not modify p-ERK, p-JNK or p-p38 levels in comparison to control cells. In addition, pre-treatment with EC or DHPAA diminished the enhanced phosphorylated levels of all three MAPKs induced by 30 mM glucose (Fig. 3). Pre-treatment with EC and DHPAA returned the glucose-enhanced p-ERK and p-p38 values to pre-stress levels, whereas the increase in p-JNK values induced by the high concentration of glucose was totally or partly prevented by EC and DHPAA, respectively. Total levels of ERK, JNK and p38 were not modified by any treatment.

3.4. Effects of EC and DHPAA on SIRT-1 and NOX-4 protein levels

SIRT-1 has an important cytoprotective role in renal cells against different types of stress, and also during diabetes (Hao & Haase, 2010). NOX-4 is reported to be a major source of ROS in the kidneys during diabetic nephropathy (Sedeek et al., 2012). To evaluate the protective effect of EC and DHPAA against a high glucose challenge, cells were pre-treated for 2 h with 10 μM EC or 10 μM DHPAA prior to 22 h of the 30 mM glucose incubation, and levels of both proteins were evaluated.

EC and DHPAA alone did not alter NOX-4 values and increased SIRT-1 levels, showing EC-incubated cells higher levels of SIRT-1 than those of DHPAA-treated cells (Fig. 4). Incubation of NRK-52E cells with the high concentration of glucose diminished the expression levels of SIRT-1 and enhanced the values of NOX-4 (Fig. 4). Besides, pre-treatment with EC and DHPAA (10 μM) restored to control values the diminished levels of SIRT-1 induced by 30 mM glucose. EC and DHPAA completely and partly prevented 30 mM glucose-induced NOX-4 expression levels, respectively (Fig. 4). All this indicate that DHPAA, and more clearly EC, protect NRK-52E cells against the redox imbalance caused by a high glucose concentration.

Table 1

Direct and protective effect of EC, DHPAA, DHBA and HPPA on ROS generation. NRK-52E cells were treated with the noted concentrations of mentioned compounds during 24 h (direct effect, without glucose, left column) or for 2 h, and then 30 mM glucose (HG) was added for 22 h to all cultures except controls (protective effect, high glucose, right column). Results are expressed as a percent relative to the control condition. Values are means \pm SD of 6–10 data. Means in a column without a common letter differ, $P < 0.05$.

Concentration	Direct effect ROS (% of control)	Concentration	Protective effect ROS (% of control)
Control	100.01 \pm 2.95 ^a	Control	99.99 \pm 2.13 ^a
	–	Glucose (30 mM)	124.13 \pm 3.04 ^b
EC	1 μ M	EC + HG	1 μ M
	5 μ M		5 μ M
	10 μ M		10 μ M
	20 μ M		20 μ M
DHPAA	1 μ M	DHPAA + HG	1 μ M
	5 μ M		5 μ M
	10 μ M		10 μ M
	20 μ M		20 μ M
DHBA	1 μ M	DHBA + HG	1 μ M
	5 μ M		5 μ M
	10 μ M		10 μ M
	20 μ M		20 μ M
HPPA	1 μ M	HPPA	1 μ M
	5 μ M		5 μ M
	10 μ M		10 μ M
	20 μ M		20 μ M

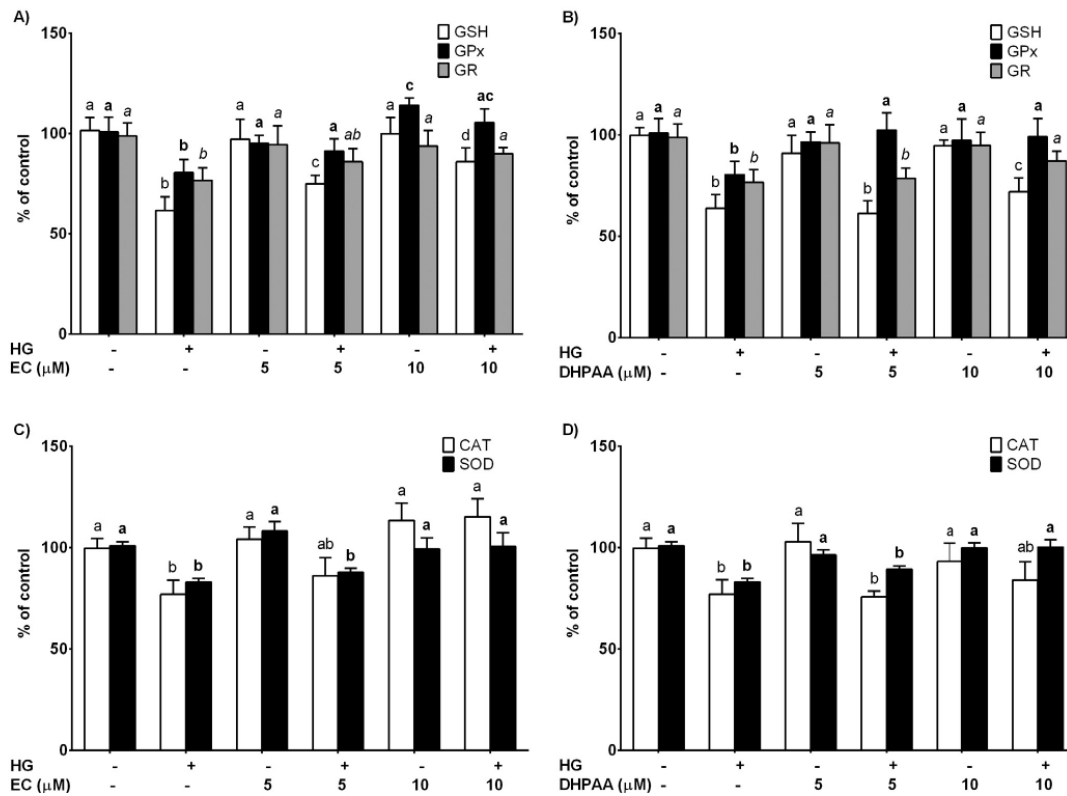


Fig. 2. Protective effect of (A and C) EC and (B and D) DHPAA on GSH levels and the activity of antioxidant enzymes GPx, GR, CAT and SOD. NRK-52E cells treated with 5–10 μ M EC or 5–10 μ M DHPAA for 2 h were later incubated with 30 mM glucose (HG) for 22 h. Data are expressed as percentage of controls. Values are means \pm SD of 6–9 different samples per condition. Different letters over a bar of the same parameter indicate statistically significant differences ($P < 0.05$). Different styles of letters (plain, bold and italics) have been used for each parameter depicted within the same graph.

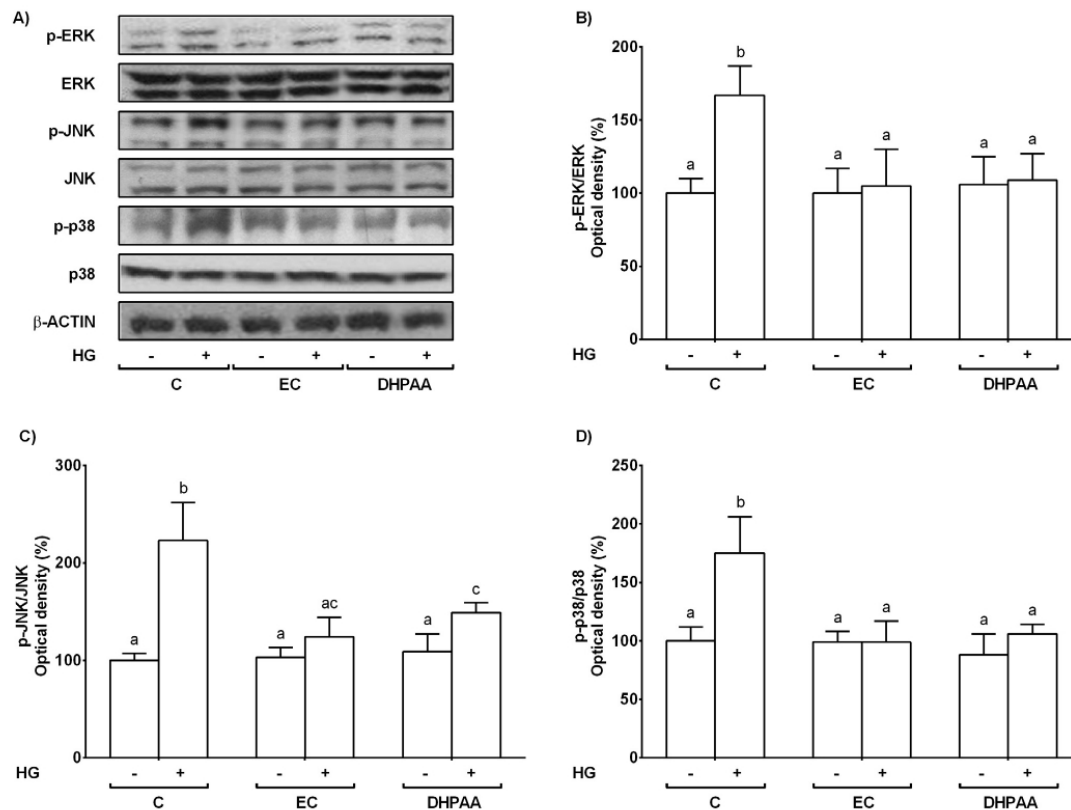


Fig. 3. Effect of EC and DHPAA on phosphorylated and total levels of ERK, JNK, p-38 in NRK-52E. Cells treated with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA for 2 h were later incubated with 30 mM glucose (HG) for 22 h. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of (B) p-ERK/ERK, (C) p-JNK/JNK and (D) p-p38/p38 ratios relative to control condition (means \pm SD, n = 5–8). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$).

3.5. NOX-4 regulates EC- and DHPAA-induced changes of ROS generation, SOD activity and SIRT-1 levels in high glucose-exposed renal proximal tubular cells

ROS-mediated injury has been reported in *in vitro* and *in vivo* models of diabetic kidney disease, NOX-4 is consider a main source of ROS in the kidney, and its expression increases in diabetes (Sedeek et al., 2012). Then, the effect of NOX-4 inhibition with DPI on cells pre-treated with EC and DHPAA (10 μ M) under high glucose conditions was analysed on ROS production, SOD activity, and NOX-4 and SIRT-1 levels.

As described above, EC and DHPAA pre-treatment prevented the decrease of SOD activity and the increase of ROS generation induced by 30 mM glucose, achieving levels similar to those of untreated cells (Fig. 5A). Under high glucose conditions, the incubation with DPI (blockage of NOX-4) suppressed the increase of ROS production induced by the high-glucose concentration, and displayed levels comparable to those of EC-treated cells. Additionally, the inhibition of NOX-4 enhanced the SOD activity to values higher than those of unchallenged cells. Similarly, under high-glucose conditions DPI incubation in cells treated with EC or DHPAA, increased SIRT-1 values and decreased NOX-4 levels in comparison to high glucose-treated cells. Thus, high glucose-treated cells that were incubated with DPI and EC displayed higher levels of SIRT-1 than DHPAA + HG + DPI-treated cells, showing in both cases greater values of SIRT-1 than those of EC-

or DHPAA-treated alone (Fig. 5B and C). Moreover, in the presence of DPI the increased levels of NOX-4 induced by the high dose of glucose were totally or partly averted in EC- and DHPAA-pre-treated cells, respectively. All these suggest that the inhibition of NOX-4 seems to act in a similar manner of that of EC and DHPAA to modulate the cellular redox status and that the NOX-4 inhibitor improved the protection induced by EC and DHPAA.

3.6. SIRT-1 regulates EC- and DHPAA-induced changes of ROS production, SOD activity and levels of NOX-4 in high glucose-challenged renal tubular cells

To further clarify the involvement of SIRT-1 in the modulation of redox status induced by EC and DHPAA (10 μ M) on high glucose-challenged cells, namely ROS, SOD activity and NOX-4 levels, the effect of a SIRT-1 selective inhibitor on these parameters was assayed. First, NRK-52E cells were pre-treated for 1 h with the SIRT-1 inhibitor (EX-527), and then treated for 2 h with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA prior to 22 h high glucose incubation (30 mM).

Fig. 6A illustrates that EC and DHPAA pre-treatment prevented the increase of ROS generation, and the decrease of SOD activity induced by 30 mM glucose, showing similar levels to those of EC- and DHPAA-treated, and untreated cells (Fig. 6A). In high glucose-challenged cells that were pre-incubated with EC or DHPAA, the inhibition of SIRT-1 maintained ROS production and SOD activity in levels comparable to

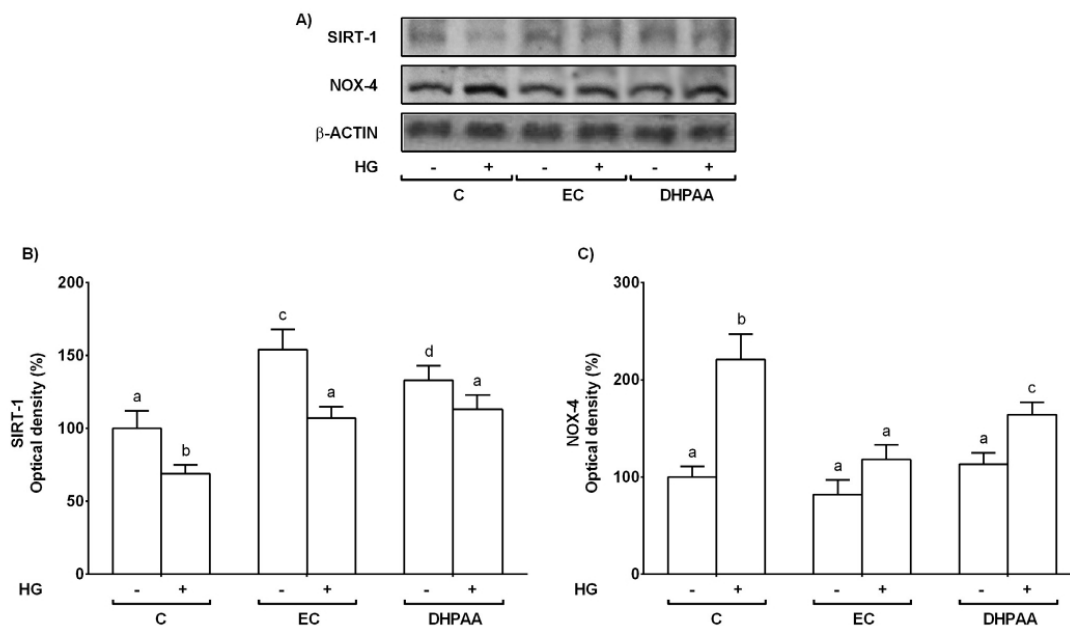


Fig. 4. Effect of EC and DHPAA on SIRT-1 and NOX-4 in NRK-52E. Cells were incubated with 10 μ M EC or 10 μ M DHPAA for 2 h prior to a 22 h-glucose (HG, 30 mM) challenge. (A) Bands of representative experiments. Densitometric quantification of total levels (B) SIRT-1 and (C) NOX-4. Values are expressed as percentage relative to the control condition (means \pm SD, n = 6–9). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$).

those of high glucose-treated cells. In addition, EC pre-incubation prevented the alteration in SIRT-1 and NOX-4 levels induced by the high-glucose concentration, similar to DHPAA pre-treatment for SIRT-1 expression values, showing in all cases comparable values to those of control cells, whereas DHPAA pre-incubation partially reverted the enhanced levels of NOX-4 induced with 30 mM glucose (Fig. 6B and C). Besides, under high-glucose conditions, the inhibition of SIRT-1 in cells pre-treated with EC or DHPAA decreased SIRT-1 levels and increased NOX-4 values in comparison to EC- and DHPAA-high glucose-treated cells, evoking lower and higher values than those of high-glucose-challenged cells for SIRT-1 and NOX-4, respectively. These results suggest the involvement of SIRT-1 in EC- and DHPAA-induced modulation of cellular redox status and indicate that the blockage of SIRT-1 abrogated the beneficial effect of EC and DHPAA on the redox balance.

4. Discussion

Nephropathy is a major complication of diabetes and a leading cause of end-stage renal disease (Forbes & Cooper, 2013; Stanton, 2011). Indeed, tubular dysfunction correlates with the decline of the renal function and early appears in the diabetic nephropathy (Forbes & Cooper, 2013; Stanton, 2011). Therefore, protection of renal tubular proximal cells is important to delay the development and progression of the diabetic nephropathy. Different studies have reported that oxidative stress plays an important role in the aetiology of this disease (Stanton, 2011), then oxidative-stress related pathways might become new targets for protecting tubular cells. In this work, for the first time it has been shown that EC and the colonic metabolite DHPAA prevent the imbalance in the cellular redox status provoked by a high concentration of glucose by reducing ROS overproduction, restoring altered antioxidant defences, and restraining signalling pathways related to stress namely MAPKs, SIRT-1 and NOX-4.

Flavanols, such as (–)-epicatechin (EC), constitute an important

group of natural compounds that have been widely reported to possess antioxidant and anti-diabetic properties (Martín et al., 2016; Martín & Ramos, 2016; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). However, their potential health effects depend on their bioavailability (Blancas-Benitez, Pérez-Jiménez, Montalvo-González, González-Aguilar, & Sáyo-Ayerdi, 2018; Martín et al., 2016; Monagas et al., 2010; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). Moreover, when evaluating the impact of phenolic compounds on health, food polyphenols and their metabolites derived from the dietary intake should be taken into account, as both seem to contribute to the potential health beneficial effects and, after the colonic fermentation, metabolites constitute a large percentage of the amount ingested (Álvarez-Cilleros et al., 2018; Fernández-Millán et al., 2014; Martín et al., 2016; Monagas et al., 2010; Shahidi & Ambigaipalan, 2015). In this regard, it is worth mentioning that the main urinary microbial phenolic acids derived from the flavanol intake are mono- and di-hydroxylated phenylpropionic and phenylacetic acids, together with hydroxybenzoic acids (Monagas et al., 2010), and that pure compounds are accumulated in tissues as a consequence of a conjugation-deconjugation cycle (Pérez-Vizcaino et al., 2006). Therefore, in the present study EC and three of the most abundant phenols found in urine after the intake of flavanol-rich foods have been selected to evaluate their protective effect against a high-glucose challenge in terms of redox status in renal proximal tubular cells. In addition, it should be mentioned that a realistic range of phenolic compound concentrations (1–20 μ M) has been selected to perform the work, since these levels could be found in biological fluids after the intake of flavanols and they are considered to be within the range recommended for *in vitro* studies (Monagas et al., 2010).

In diabetes oxidative stress has been proved as a result of long-term high glucose levels exposure, and mediates diabetic complications (Stanton, 2011). Consistent with this, our results showed that a high concentration of glucose led to an overproduction of ROS, and diminished antioxidant defences such as GSH content, and activities of GPx,

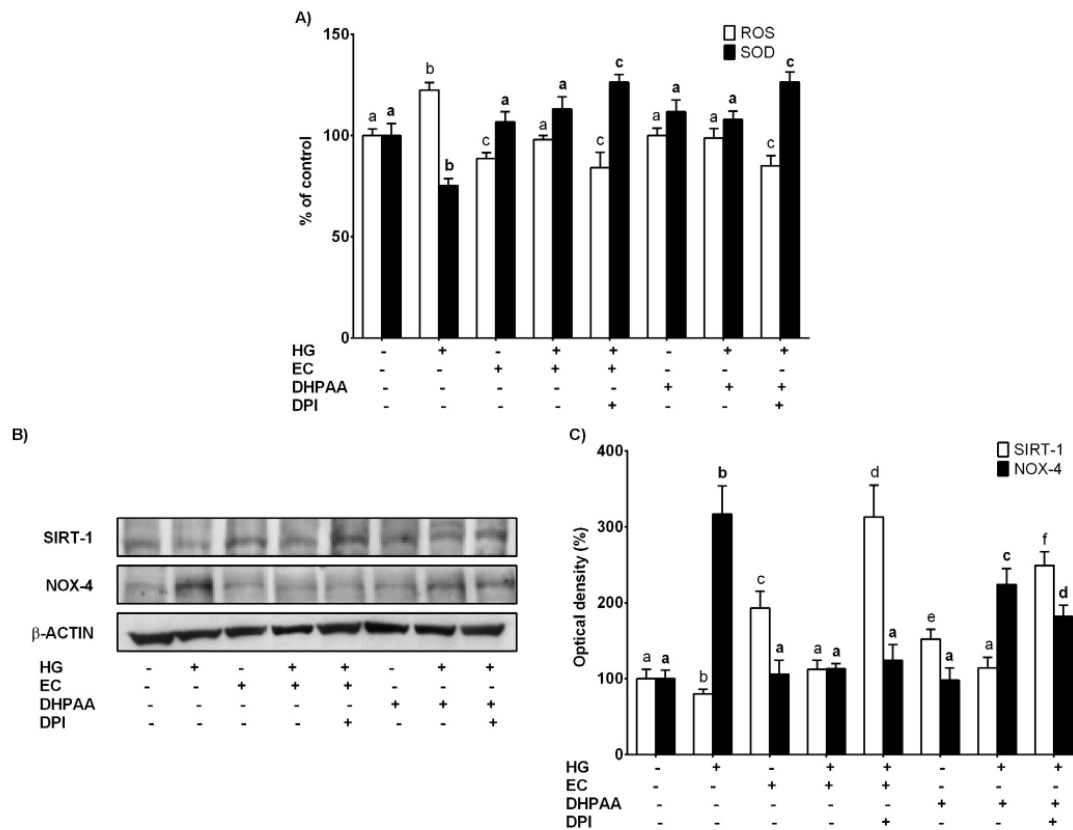


Fig. 5. Effect of EC and DHPAA and an inhibitor of NOX (DPI) on ROS generation, SOD activity, and total levels of SIRT-1 and NOX-4. NRK-52E cells incubated for 1 h with 10 μ M DPI were later treated with 10 μ M EC or DHPAA for 2 h prior to 22 h-glucose (HG, 30 mM) challenge. (A) Intracellular ROS production and activity of SOD are expressed as percentage of control (means \pm SD, n = 6–8). (B) Bands of representative experiments. (C) Percentage data of total levels of SIRT-1 and NOX-4 relative to the control condition (means \pm SD, n = 6–9). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$). Different styles of letters (plain and bold) have been used for each parameter depicted within the same graph.

GR, SOD and CAT in renal proximal tubular NRK-52E cells. Indeed, both the augmented production of oxidants and the decreased actions of antioxidants play roles in the increased oxidative stress in diabetic nephropathy and have been reported to occur in renal cells under high glucose conditions *in vitro* and *in vivo* (Hou et al., 2014; Quine & Raghu, 2005; Zhang et al., 2013).

Under high glucose conditions, EC and DHPAA prevented the imbalance of the redox status caused by the high glucose challenge in renal tubular cells, as they restrained the increase in ROS generation and the decrease of GSH content, as well as in GPx, GR, SOD and CAT activities. In agreement with our results, other natural compounds such as peppermint infusions, glycyrrhizic acid and beta-casomorphin-7 alleviated the high-glucose-induced alteration in the redox status of the kidney in diabetic animals and in renal cultured cells (Figueroa-Pérez et al., 2018; Hou et al., 2014; Zhang et al., 2013). Similarly, EC and the NADPH oxidase inhibitor, apocynin, have been reported to prevent the renal imbalance of the redox status in animal models of diabetes (Quine & Raghu, 2005; Winiarska et al., 2014). EC and DHPAA also prevented protein oxidation under oxidative stress conditions in insulin-sensitive tissues (Cordero-Herrera et al., 2015a; Fernández-Millán et al., 2014), and EC has demonstrated a dose-dependent superoxide anion and hydroxyl radical scavenging activity *in vitro* (Prince, 2013). Therefore, a relevant role of EC and DHPAA in the redox balance by quenching

superoxide anions and hydroxyl radicals should not be ruled out. Indeed, all these preventive effects have been related to a more efficient ROS quenching in flavanol pre-treated cells or animals, and to a reinforcement in the activity of antioxidant enzymes, which prepares cells to deal with ROS generation in the presence of stressors and thus to suppress or minimize the oxidative-stress induced damage (Cordero-Herrera et al., 2015a; Quine & Raghu, 2005; Vranješ, Popović, Štajner, Ivetić, Mandić, Vranješ, 2016; Winiarska et al., 2014). These subjects deserve further studies.

Oxidative stress induced by hyperglycaemia activates key stress mediators, such as MAPKs, which play an important role in the pathogenesis of the diabetic nephropathy (Forbes & Cooper, 2013). Accordingly, increased phosphorylated levels of all three MAPKs were found in high-glucose challenged NRK-52E cells. Additionally, pre-treatment with EC or DHPAA prevented the activation of the three MAPKs in renal tubular cells treated with the high concentration of glucose. Consistent with this, in renal proximal tubular cells exposed to 60 mM glucose for 48 h the dimer of EC, procyanidin B2, decreased the phosphorylation of p38, showing a protective anti-fibrotic effect (Li et al., 2015). Similarly, it has been shown that in renal cells other phenolic compounds such as apigenin, a novel chalcone, a curcumin derivative, and the main flavanol in green tea, epigallocatechin-3-gallate, exert anti-diabetic effects through the down-regulation of MAPKs

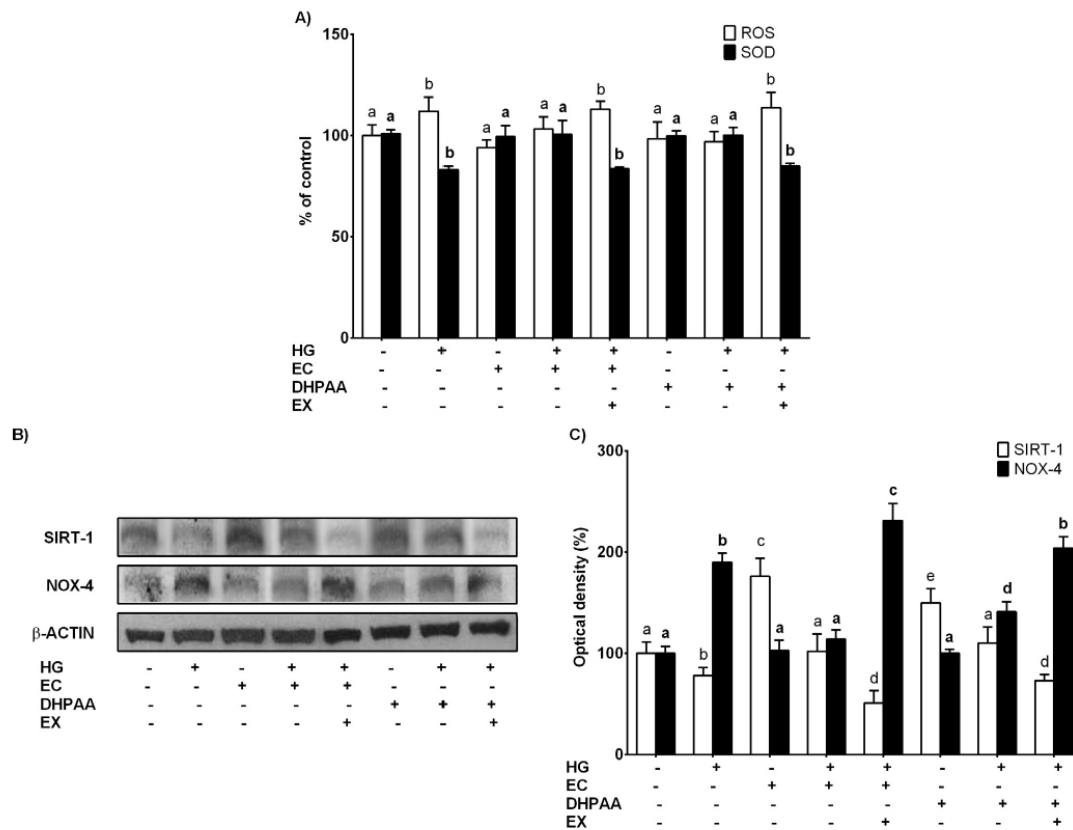


Fig. 6. Effect of EC and DHPAA and a selective inhibitor of SIRT-1 (EX, EX-527) on intracellular ROS production, SOD activity, and SIRT-1 and NOX-4 total levels. NRK-52E cells incubated with 10 μ M EX for 1 h were later incubated with 10 μ M EC or DHPAA for 2 h prior to 22 h-glucose (HG, 30 mM) challenge. (A) Intracellular ROS production and activity of SOD are expressed as percentage of control (means \pm SD, n = 6–9). Different letters over bars indicate statistically significant differences ($P < 0.05$). Different styles of letters (plain, bold and italics) have been used for each parameter depicted within the same graph. (B) Bands of representative experiments. (C) Percentage data of total levels of SIRT-1 and NOX-4 relative to the control condition (means \pm SD, n = 7–9). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Different letters over bars indicate statistically significant differences ($P < 0.05$). Different styles of letters (plain and bold) have been used for each parameter depicted within the same graph.

in vitro and *in vivo* (Fang et al., 2015; Malik et al., 2017; Pan et al., 2013; Yang et al., 2016).

NOX-4 has been recently suggested to contribute to the initiation and development of renal injury in diabetic nephropathy, whereas the inhibition of NOX-4 alleviates the tubular-induced injury (Qi, Niu, Qin, Qiao, & Gu, 2015; Sedeek et al., 2012; Stanton, 2011). In agreement, the present results demonstrated for the first time that EC and DHPAA prevented the high-glucose-induced NOX-4 expression and contribute to the cellular redox balance. This is supported by our findings that inhibiting NOX-4 in EC- and DHPAA-pre-treated cells prevented the high-glucose-induced ROS generation, as well as the decreased SOD activity and SIRT-1 levels, since the NOX-4 inhibitor enhanced the protection induced by EC and DHPAA. Previous studies performed with a cocoa-enriched in flavanols, naringin and antioxidants such as N-acetylcysteine (NAC) or NOX-4 inhibitors (DPI and plumbagin) have demonstrated that those compounds exerted renoprotective effects by improving the functionality of renal tubular cells *in vitro* and *in vivo* (Papadimitriou, Peixoto, Silva, Lopes de Faria, & Lopes de Faria, 2014; Qi et al., 2015; Shimizu, Saito, Higashiyama, Nishijima, & Niwa, 2013; Yong et al., 2013; Zhang, Yang, Li, Chen, & Shi, 2017). Moreover, in renal proximal tubular cells it has been shown that NOX-4 levels were

upregulated and SOD reduced in diabetic nephropathy, and in concordance, the blockage of NOX-4 increased SOD activity and reduced oxidative stress markers (Jeong et al., 2018; Yong et al., 2013). All these suggest for the first time that EC and DHPAA might have a key role to inhibit NOX-4 and to prevent the damage in high-glucose-treated renal tubular cells.

The activation of SIRT-1 contributes to increase the resistance to metabolic and oxidative stress (Hao & Haase, 2010). In agreement with our results, it has been reported that SIRT-1 levels are decreased in diabetic patients, as well as in high-glucose-treated renal tubular cells (Hao & Haase, 2010; Hou et al., 2014); indeed the therapeutic use of sirtuins is currently in clinical trials, as they are likely to improve the diabetic condition in humans (Hao & Haase, 2010). In the present work, EC and DHPAA alone increased SIRT-1 levels in NRK-52E cells, in agreement with other studies performed with other flavonoids such as puerarin, and with the stilbene resveratrol in renal cultured cells, and cocoa and EC in adipose tissue of rats (Huang et al., 2016; Li et al., 2017; Rabadan-Chávez, Quevedo-Corona, Miliar-García, Reyes-Maldonado, & Jaramillo-Flores, 2016). Additionally, pre-treatment with EC and DHPAA prevented the decrease of SIRT-1 levels induced by the high glucose challenge. Consistent with these findings, grape seed

procyanidin B2, glycyrrhizic acid, and puerarin avoided SIRT-1 diminution under high-glucose conditions, which was associated with a protective effect and improved redox balance in renal cells (Bao, Cai, Zhang, & Li, 2015; Hou et al., 2014; Li et al., 2017).

The inhibition of SIRT-1 enables to understand better the cross-talk between SIRT-1 and the modulation of the cellular redox status. In our study, the blockage of SIRT-1 abolished the protective effects exerted by EC and DHPAA under high glucose conditions, as enhanced ROS generation and NOX-4 levels, and decreased SOD activity were found. These features suggested that SIRT-1 directly or indirectly regulates key proteins to modulate the cellular redox status. As far as we know, the role of SIRT-1 induction evoked by flavanols or their metabolites on NOX-4 and SOD activity in renal tubular cells has not been previously studied. However, it has been demonstrated that the inhibition of SIRT-1 caused by high concentrations of glucose was associated with a deterioration in the redox status of renal cells, i.e.: enhanced ROS generation and NOX-4 levels, and decreased SOD activity (Hou et al., 2014; Li et al., 2017). Additionally, it could be mentioned that in podocytes puerarin conferred a cytoprotective effect by decreasing NOX-4 expression through SIRT-1 activation (Li et al., 2017).

Interestingly, antioxidant treatments, such as N-acetylcysteine administration, have demonstrated to play a role against the oxidative stress in renal cells during diabetes, as restored both decreased levels of GSH and diminished activities of GPx and SOD, and inhibited NOX enzymes, resulting in the attenuation of the oxidative damage in renal cells (Lei et al., 2012; Ribeiro et al., 2011; Shimizu et al., 2013). In addition, it should be considered that enhanced levels of ROS activate inflammatory mediators and different signalling pathways apart from the mechanisms studied in the present work (Forbes & Cooper, 2013; Martín & Ramos, 2016). In this line, it has been reported that EC is able to prevent the inflammatory response in the kidney through the downregulation of redox-sensitive pro-inflammatory pathways, such as NF- κ B, NOX, TNF α , iNOS, and IL-6 (Prince, Fischerman, Toblli, Fraga, & Galleano, 2017; Prince et al., 2016). Likewise, an extract from *Albizia harveyi* containing EC showed an anti-diabetic effect in rats, which could be related to a modulatory effect on relevant enzymes implicated in the renal dysfunction in diabetes, such as aldose reductase (Sobeh et al., 2017); indeed docking studies showed that EC interacted with the active site of α -amilase, maltase-glucoamylase, and aldose reductase (Sobeh et al., 2017). Further studies are needed to elucidate how different molecular mechanisms related to the oxidative stress are modulated by EC and DHPAA in renal tubular cells.

In summary, we show for the first time that EC and the flavanol colonic metabolite DHPAA exert renoprotective effects by contributing to the balance of the cellular redox status, as under high glucose conditions both compounds prevented ROS generation, activation of stress related key proteins (MAPKs and NOX-4), as well as the diminution of antioxidant defences and SIRT-1 levels. We have also revealed a new mechanism by which EC and DHPAA modulate the redox balance in NRK-52E cells, in which the NOX-4/SIRT-1 signalling plays a main role. All together, this study provides new evidences on the beneficial effects of the cocoa flavanol EC and the colonic metabolite DHPAA on the protection of renal function under a high glucose condition.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the grant AGL2015-67087-R (MINECO/FEDER, UE) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MINECO). D. Álvarez-Cilleros is a FPI fellow from the predoctoral program of MINECO (BES-2016-076721).

References

- Álvarez-Cilleros, D., Martín, M. A., & Ramos, S. (2018). (–)-Epicatechin and the colonic 2,3-dihydroxybenzoic acid metabolite regulate glucose uptake, glucose production, and improve insulin signaling in renal NRK-52E cells. *Molecular Nutrition & Food Research*. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201700470>.
- Bao, L., Cai, X., Zhang, Z., & Li, Y. (2015). Grape seed procyanidin B2 ameliorates mitochondrial dysfunction and inhibits apoptosis via the AMP-activated protein kinase-silent mating type information regulation 2 homologue 1-PPAR γ co-activator-1 α axis in rat mesangial cells under high-dose glucosamine. *British Journal of Nutrition*, 113, 35–44.
- Barnett, C. F., Moreno-Ulloa, A., Shiva, S., Ramirez-Sanchez, I., Taub, P. R., Su, Y., ... Villarreal, F. (2015). Pharmacokinetic, partial pharmacodynamic and initial safety analysis of (–)-Epicatechin in healthy volunteers. *Food & Function*, 6, 824–833.
- Blancas-Benitez, F. J., Pérez-Jiménez, J., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. A., & Sáys-Ayerdi, S. G. (2018). In vitro evaluation of the kinetics of the release of phenolic compounds from guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Journal of Functional Foods*, 43, 139–145.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2015a). Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high glucose-induced oxidative stress. Relevance of MAPKs. *Molecular Nutrition & Food Research*, 59, 597–609.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2015b). Cocoa intake ameliorates hepatic oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. *Food Research International*, 69, 194–201.
- Fang, Q., Zhao, L., Wang, Y., Zhang, Y., Li, Z., Pan, Y., ... Liang, G. (2015). A novel chalcone derivative attenuates the diabetes-induced renal injury via inhibition of high glucose-mediated inflammatory response and macrophage infiltration. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282, 129–138.
- Fernández-Millán, E., Ramos, S., Alvarez, C., Bravo, L., Goya, L., & Martín, M. A. (2014). Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butylhydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food and Chemical Toxicology*, 66, 245–253.
- Figuerola-Pérez, M. G., Pérez-Ramírez, I. F., Enciso-Moreno, J. A., Gallegos-Corona, M. A., Salgado, L. M., & Reynoso-Camacho, R. (2018). Diabetic nephropathy is ameliorated with peppermint (*Mentha piperita*) infusions prepared from salicylic acid-elicited plants. *Journal of Functional Foods*, 43, 55–61.
- Forbes, J. M., & Cooper, M. E. (2013). Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews*, 93, 137–188.
- Giacometti, J., Muhvic, D., Pavletic, A., & Dudaric, D. (2016). Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, antiinflammatory, anticarcinogenic, and antineurotic activity in carbon tetrachloride intoxicated mice. *Journal of Functional Foods*, 23, 177–187.
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Goya, L., Bravo, L., & Ramos, S. (2009). Time-course regulation of survival pathways by epicatechin on HepG2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20, 115–124.
- Granado-Serrano, A. B., Martín, M. A., Izquierdo-Pulido, M., Goya, L., Bravo, L., & Ramos, S. (2007). Molecular mechanisms of (–)-epicatechin and chlorogenic acid on the regulation of the apoptotic and survival/proliferation pathways in a human hepatoma cell line. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 55, 2020–2027.
- Hao, C.-M., & Haase, V. H. (2010). Sirtuins and their relevance to the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 21, 1620–1627.
- Hissin, P., & Hilf, R. (1976). A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74, 214–226.
- Hou, S., Zheng, F., Li, Y., Gao, L., & Zhang, J. (2014). The protective effect of glycyrrhizic acid on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 15026–15043.
- Huang, Y. T., Chen, Y. Y., Lai, Y. H., Cheng, C. C., Lin, T. C., Su, Y. S., ... Lai, P. C. (2016). Resveratrol alleviates the cytotoxicity induced by the radiocontrast agent, iohalate, by reducing the production of reactive oxygen species in HK-2 human renal proximal tubule epithelial cells in vitro. *International Journal of Molecular Medicine*, 37, 83–91.
- Jeong, B. Y., Lee, H. Y., Park, C. G., Kang, J., Yu, S. L., Choi, D. R., ... Yoon, S. H. (2018). Oxidative stress caused by activation of NADPH oxidase 4 promotes contrast-induced acute kidney injury. *PLoS One*, 13(1), e0191034.
- Lei, S., Liu, Y., Liu, H., Yu, H., Wang, H., & Xia, Z. (2012). Effects of N-acetylcysteine on nicotinamide dinucleotide phosphate oxidase activation and antioxidant status in heart, lung, liver and kidney in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Medical Journal*, 53, 294–303.
- Li, D., Zhao, T., Meng, J., Jing, Y., Jia, F., & He, P. (2015). Procyanidin B2 inhibits high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in HK-2 human renal proximal tubular epithelial cells. *Molecular Medicine Reports*, 8148–8154.
- Li, X., Cai, W., Lee, K., Liu, B., Deng, Y., Chen, Y., ... Zhong, Y. (2017). Puerarin attenuates diabetic kidney injury through the suppression of NOX4 expression in podocytes. *Scientific Reports*, 7, 14603.
- Loke, W. M., Hodgson, J. M., Proudfoot, J. M., McKinley, A. J., Puddey, I. B., & Croft, K. D. (2008). Pure dietary flavonoids quercetin and (–)-epicatechin augment nitric oxide products and reduce endothelin-1 acutely in healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*, 88, 1018–1025.
- Malik, S., Suchal, K., Khan, S. I., Bhatia, J., Kishore, K., Dinda, A. K., & Arya, D. S. (2017). Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-NF- κ B-TNF- α and TGF- β 1-MAPK-fibronectin pathways. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 313(2), F414–F422.
- Martín, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2016). Antidiabetic actions of cocoa flavanols.

- Molecular Nutrition & Food Research*, 60, 1756–1769.
- Martín, M. A., Granado-Serrano, A. B., Ramos, S., Izquierdo Pulido, M., Bravo, L., & Goya, L. (2010). Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 196–205.
- Martín, M. A., & Ramos, S. (2016). Cocoa polyphenols in oxidative stress: Potential health implications. *Journal of Functional Foods*, 27, 570–588.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sanchez-Patan, F., Llorach, R., Garrido, I., Gomez-Cordoves, C., ... Bartolome, B. (2010). Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & Function*, 1, 233–253.
- Ottaviani, J. I., Borges, G., Momma, T. Y., Spencer, J. P. E., Keen, C. L., Crozier, A., & Schroeter, H. (2016). The metabolome of [2-14C](–)-epicatechin in humans: Implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Scientific Reports*, 6, 29034.
- Pan, Y., Zhu, G., Wang, Y., Cai, L., Cai, Y., Hu, J., ... Liang, G. (2013). Attenuation of high-glucose-induced inflammatory response by a novel curcumin derivative B06 contributes to its protection from diabetic pathogenic changes in rat kidney and heart. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 146–155.
- Papadimitriou, A., Peixoto, E. B. M. I., Silva, K. C., Lopes de Faria, J. M., & Lopes de Faria, J. B. (2014). Increase in AMPK brought about by cocoa is renoprotective in experimental diabetes mellitus by reducing NOX4/TGFβ-1 signaling. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25, 773–784.
- Pérez-Vizcaino, F., Bishop-Bailey, D., Lodi, F., Duarte, J., Cogolludo, A., Moreno, L., ... Warner, T. (2006). The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Comm*, 346, 919–925.
- Prince, P. D., Fischerman, L., Toblli, J. E., Fraga, C. G., & Galleano, M. (2017). LPS-induced renal inflammation is prevented by (–)-epicatechin in rats. *Redox Biology*, 11, 342–349.
- Prince, P. D., Rodríguez-Lanzi, C., Toblli, J. E., Elesgaray, R., Oteiza, P. I., Fraga, C. G., & Galleano, M. (2016). Dietary (–)-epicatechin mitigates oxidative stress, NO metabolism alterations, and inflammation in renal cortex from fructose-fed rats. *Free Radical Biology & Medicine*, 90, 35–46.
- Prince, P. S. M. (2013). (–)Epicatechin attenuates mitochondrial damage by enhancing mitochondrial multi-marker enzymes, adenosine triphosphate and lowering calcium in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 409–416.
- Qi, W., Niu, J., Qin, Q., Qiao, Z., & Gu, Y. (2015). Glycated albumin triggers fibrosis and apoptosis via an NADPH oxidase/Nox4-MAPK pathway-dependent mechanism in renal proximal tubular cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 405, 74–83.
- Quine, S. D., & Raghu, P. S. (2005). Effects of (–)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacological Reports*, 57, 610–615.
- Rabadan-Chávez, G., Quevedo-Corona, L., Miliar-García, A., Reyes-Maldonado, E., & Jaramillo-Flores, M. E. (2016). Cocoa powder, cocoa extract and epicatechin attenuate hypercaloric diet-induced obesity through enhanced β-oxidation and energy expenditure in white adipose tissue. *Journal of Functional Foods*, 20, 54–67.
- Ramiro-Puig, E., Casadesus, G., Lee, H. G., Zhu, X., McShea, A., Perry, G., ... Castell, M. (2009). Neuroprotective effect of cocoa flavonoids on in vitro oxidative stress. *European Journal of Nutrition*, 48, 54–61.
- Ribeiro, G., Roehrs, M., Bairo, A., Moro, A., Charão, M., Araújo, F., ... Garcia, S. C. (2011). N-acetylcysteine on oxidative damage in diabetic rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 1–8.
- Sedek, M., Montezano, A. C., Hebert, R. L., Gray, S. P., Di Marco, E., Jha, J. C., ... Touyz, R. M. (2012). Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes-potential targets for novel therapies. *Journal of Cardiovascular Translational Research*, 5, 509–518.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820–897.
- Shimizu, H., Saito, S., Higashiyama, Y., Nishijima, F., & Niwa, T. (2013). CREB, NF-κB, and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 304(7), C685–C692.
- Sobeh, M., Mahmoud, M. F., Abdelfattah, M. A. O., El-Beshbishy, H. A., El-Shazly, A. M., & Wink, M. (2017). *Albizia harveyi*: Phytochemical profiling, antioxidant, antidiabetic and hepatoprotective activities of the bark extract. *Medicinal Chemistry Research*, 26, 3091–3105.
- Stanton, R. C. (2011). Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Current Diabetes Reports*, 11, 330–336.
- Vranješ, M., Popović, B. M., Štajner, D., Ivetić, V., Mandić, A., & Vranješ, D. (2016). Effects of bearberry, parsley and corn silk extracts on diuresis, electrolytes composition, antioxidant capacity and histopathological features in mice kidneys. *Journal of Functional Foods*, 21, 272–282.
- Winiarska, K., Focht, D., Sierakowski, B., Lewandowski, K., Orlowska, M., & Usarek, M. (2014). NADPH oxidase inhibitor, apocynin, improves renal glutathione status in Zucker diabetic fatty rats: A comparison with melatonin. *Chemico-Biological Interactions*, 218, 12–19.
- Yang, X. H., Pan, Y., Zhan, X. L., Zhang, B. L., Guo, L. L., & Jin, H. M. (2016). Epigallocatechin-3-gallate attenuates renal damage by suppressing oxidative stress in diabetic db/db mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2968462.
- Yong, R., Chen, X. M., Shen, S., Vijayaraj, S., Ma, Q., Pollock, C. A., & Saad, S. (2013). Plumbagin ameliorates diabetic nephropathy via interruption of pathways that include NOX4 signalling. *PLoS One*, 8(8), e73428.
- Zhang, J., Yang, S., Li, H., Chen, F., & Shi, J. (2017). Naringin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting NADPH oxidase 4. *European Journal of Pharmacology*, 804, 1–6.
- Zhang, W., Miao, J., Wang, S., & Zhang, Y. (2013). The protective effects of beta-casomorphin-7 against glucose-induced renal oxidative stress in vivo and vitro. *PLoS One*, 8(5), e63472.

1.2. Resumen de los estudios renales en animales de experimentación.

1.2.1. Artículo IV.



La DN es una complicación microvascular frecuente en los pacientes diabéticos. Los principales síntomas clínicos incluyen modificaciones estructurales y funcionales en el glomérulo y los túbulos, lo que altera la funcionalidad renal y conduce a la aparición de proteinuria, expansión glomerular, fibrosis tubular, etc. y, a largo plazo, al deterioro irreversible de la función renal. Dado que en la actualidad no existen tratamientos efectivos frente a la DN más allá del alivio de los síntomas (control de la glucemia, diálisis y trasplante de riñón), el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas efectivas son críticas para los pacientes con DN. En este sentido, distintas investigaciones han demostrado los efectos antidiabéticos del cacao debido a su capacidad para disminuir la glucemia. No obstante, sus efectos beneficiosos en la homeostasis glucídica renal y los mecanismos moleculares mediante los que ejerce sus potenciales efectos beneficiosos aún se desconocen.

El objetivo de este estudio consistió en evaluar las propiedades antidiabéticas del cacao y la valoración de sus potenciales acciones sobre la homeostasis glucídica y la regulación de la señalización de la insulina en el córtex renal de las ratas ZDF.

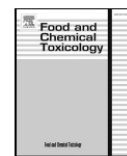
Para llevar a cabo estos estudios sobre el posible efecto protector del cacao se ha empleado un modelo animal, las ratas ZDF. Se trata de animales hiperfágicos que están predispuestos a desarrollar la T2D. En este trabajo se dispusieron tres grupos experimentales: las ratas macho ZL (animales control que no desarrollan la T2D) y un grupo de animales ZDF, ambos alimentados con la dieta control (ZDF-C), y otro grupo de ratas ZDF que recibió una dieta enriquecida en cacao al 10% (ZDF-Co). Las investigaciones se llevaron a cabo desde la semana diez a la veinte de vida. A continuación, se evaluaron parámetros fisiológicos y morfológicos, y en los homogenados de córtex renal se analizaron los niveles del GLUT-2 y del SGLT-2, así como las proteínas

claves de la ruta de señalización de la insulina (el IR), de la gluconeogénesis (la PEPCK y la G-6-Pasa) y de la glucogenogénesis (la GSK3 y la GS).

Los resultados obtenidos mostraron que las ratas diabéticas alimentadas con cacao disminuyeron su peso corporal, glucemia e insulinemia, a la vez que mejoraron la tolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina y las alteraciones estructurales en la corteza renal (hipertrofia tubular y glomerular, expansión mesangial y del espacio de Bowman, y dilatación de los túbulos) en comparación con los animales ZDF-C. Además, la dieta rica en cacao previno la disminución de los niveles fosforilados de la proteína IR y la inactivación de la ruta de la GSK3/GS en el córtex renal de las ratas diabéticas. También, se demostró que el efecto antidiabético del cacao parecía estar mediado por la capacidad del cacao para disminuir los niveles de la PEPCK, de la G-6-Pasa y de los transportadores GLUT-2 y SGLT-2 en la corteza renal de las ratas ZDF-Co.

Todos estos resultados han permitido concluir que la alimentación con una dieta rica en cacao atenúa el daño renal al contribuir a modular la homeostasis glucídica y mantener la morfología del órgano en las ratas T2D.

La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por el apoyo en el cuidado y mantenimiento del modelo *in vivo*, así como por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: el WB, el GTT y la cuantificación de parámetros fisiológicos con kits comerciales. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.



Cocoa intake attenuates renal injury in Zucker Diabetic fatty rats by improving glucose homeostasis

David Álvarez-Cilleros^a, Elvira López-Oliva^b, Luis Goya^a, María Ángeles Martín^{a,c}, Sonia Ramos^{a,*}

^a Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain

^b Sección Departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Cocoa
Glucose homeostasis
Glucose tolerance
Insulin resistance
Renal cortex structural alterations
Type 2 diabetic ZDF rats

ABSTRACT

Glucotoxicity (high levels of glucose) is a major factor in the pathogenesis of diabetic kidney disease. Cocoa has anti-diabetic effects by lowering glucose levels. However, whether cocoa exerts beneficial effects on the renal cortex glucose homeostasis and the molecular mechanisms responsible for this possible protective activity remain largely unknown. Thus, the potential anti-diabetic properties of cocoa on insulin signalling, glucose transporters and gluconeogenic enzymes were evaluated in the renal cortex of Zucker Diabetic fatty (ZDF) rats. Male ZDF rats were fed a control or cocoa-rich diet (10%), and Zucker Lean animals received the control diet. ZDF rats supplemented with cocoa (ZDF-Co) showed decreased body weight gain, glucose and insulin levels, improved glucose tolerance, insulin resistance and structural alterations in renal cortex. Moreover, cocoa-rich diet ameliorated insulin resistance by reverting decreased tyrosine-phosphorylated-insulin receptor levels and by preventing the inactivation of glycogen synthase kinase-3/glycogen synthase pathway (GSK-3/GS) in the renal cortex of ZDF-Co rats. Cocoa antihyperglycaemic effect also appeared to be mediated through the diminution of phosphoenolpyruvate-carboxykinase (PEPCK), glucose-6-phosphatase (G-6-Pase), sodium-glucose-co-transporter-2 (SGLT-2), and glucose-transporter-2 (GLUT-2) levels in ZDF-Co rat's renal cortex. These findings demonstrate that cocoa alleviates renal injury by contributing to maintain the glucose homeostasis in type 2 diabetic ZDF rats.

1. Introduction

Diabetic kidney disease is one of the main causes of death in diabetic patients, and affects 15–25% of them (Persson and Rossing, 2018; Winocour, 2018). Clinically, diabetic kidney disease is characterized by a progressive renal damage accompanied by increasing albuminuria and subsequent impaired renal function, as altered glomerular filtration rate (GFR), among other modifications. Morphologically, different changes occur, such as mesangial expansion and thickening of the glomerular basement membrane, later followed by glomerulosclerosis (Forbes and Cooper, 2013; Persson and Rossing, 2018; Thomas et al., 2015). Nevertheless, the proximal tubules, which constitute more than 90% of the cortical mass of the kidney, are especially sensitive to the injury and suffer the greatest changes in growth during diabetes, become atrophic and their basement membranes thickened (Forbes and Cooper, 2013). Importantly, glucotoxicity, i.e. hyperglycaemia or sustained high levels of glucose, is recognized as a main factor in these

pathological alterations (Forbes and Cooper, 2013; Persson and Rossing, 2018; Thomas et al., 2015).

Kidneys play a relevant role in the maintenance of glucose homeostasis (Forbes and Cooper, 2013). During diabetes gluconeogenesis and glucose uptake are increased in the renal cortex, and also the insulin signalling pathway seems to be altered, contributing all these pathological changes to sustain the high levels of glucose. (Artunc et al., 2016; Mitrakou, 2011; Rahmoune et al., 2005). Consequently, the achievement of an optimal glycaemic control constitutes the most effective way to prevent or reduce the risk for diabetic complications, including the diabetic kidney disease.

Cocoa and its derived products are widely consumed in Europe and the United States (Vinson et al., 2006), and have shown beneficial effects against diabetes in humans (Costa et al., 2017; Grassi et al., 2008; Kim et al., 2016; Martín et al., 2016; Martín et al., 2017). Accordingly, cocoa and its flavanols have demonstrated anti-diabetic effects related to their ability to improve the insulin sensitivity (Álvarez-Cilleros et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: s.ramos@ictan.csic.es (S. Ramos).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.002>

Received 4 February 2019; Received in revised form 1 March 2019; Accepted 2 March 2019

Available online 07 March 2019

0278-6915/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations

AUC	area under curve
eGFR	estimated glomerular filtration rate
GLUT	glucose transporter
G-6-Pase	glucose-6-phosphatase
GS	glycogen synthase
GSK-3	glycogen synthase kinase-3
GTT	glucose tolerance test
Hb1Ac	hemoglobin glycosylated

H&E	haematoxylin and eosin
HOMA-IR	homeostasis model assessment of insulin resistance
HOMA-IS	homeostasis model assessment of insulin sensitivity
IR	insulin receptor
PAS	periodic-acid-Schiff
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase
PFA	paraformaldehyde
SGLT-2	sodium-glucose co-transporter-2
ZDF	Zucker diabetic rat
ZL	Zucker Lean

2018; Cordero-Herrera et al., 2015; Cordero-Herrera et al., 2014; Grassi et al., 2008; Zhang et al., 2013), to contribute to the glucose homeostasis, which was associated to decreased blood glucose levels (Cordero-Herrera et al., 2015; Grassi et al., 2008; Jalil et al., 2008; Muthenna et al., 2014; Ruzaidi et al., 2005), and to protect renal functionality, and structure (Igarashi et al., 2007; Muthenna et al., 2014; Papadimitriou et al., 2014; Zhang et al., 2013; Zhu et al., 2014). Remarkably, in diabetes glomerulus alterations have classically been studied, but recently it has been demonstrated that tubular damage is earlier induced than glomerular injury (Hasegawa et al., 2013) and that tubular impairment sensitizes glomeruli to injury through the tubuloglomerular feedback (Wang et al., 2018). Moreover, and to the best of our knowledge, despite the pivotal role of proximal tubules on the glucose homeostasis limited works have evaluated the effects of cocoa on the kidney, especially in the renal cortex, in a widely used animal model that mimics human type 2 diabetes, such as Zucker diabetic fatty [ZDF; *ZDF/crl-lepr* (fa/fa)] rats. Therefore, to understand the potential anti-diabetic activity of cocoa, the aim of this study was to investigate the effects of a cocoa-rich diet on renal morphology, functionality, as well as on the molecular mechanisms connected to the regulation of glucose levels, such as insulin signalling, gluconeogenesis and glucose transporter contents in the renal cortex of ZDF rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

Anti-GSK-3 α/β and anti-phospho-GSK-3 α/β recognizing phosphorylated Ser21/9 of GSK-3, anti-GS and anti-phospho-GS detecting phosphorylated Ser641 of GS, and anti- β -actin were obtained from Cell Signalling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-IR β and anti-phospho-IR β recognizing phosphorylated Tyr1150/1151 of IR, anti-PEPCK, anti-G-6-Pase and anti-SGLT-2 were purchased from Santa Cruz (sc-711, sc-81500, sc-32879 sc-25840 and sc-98975, respectively, Qimigen, Madrid, Spain). Anti-GLUT-2 was obtained from Millipore (Madrid, Spain). Glycated haemoglobin (HbA1c) and albumin kits were purchased from Spinreact (BioAnalitica, Madrid, Spain), rat insulin ELISA kit was acquired from Mercodia (AD Bioinstruments, Barcelona, Spain), glucose assay kit was from Sigma (Madrid, Spain), creatinine kit was obtained from Linear Chemicals S.L. (Barcelona, Spain), and the glycogen fluorometric assay kit was from BioVision (Deltaclon, Madrid, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis were from BioRad Laboratories S.A. (Madrid, Spain).

2.2. Cocoa

Natural Forastero cocoa powder (a kind gift from Idilia S.L., Barcelona, Spain) was used for this study. A detailed description of this cocoa is given elsewhere (Cordero-Herrera et al., 2015; Martín et al., 2008).

Diets were prepared from an AIN-93G formulation (Panlab S.L., Barcelona, Spain) providing all nutrients required by adult rats. Briefly, AIN-93G formulation lacking cellulose, starch and sucrose was

prepared by adding the mentioned ingredients to adjust the quantities of carbohydrate and fibre according to the amount of cocoa added. Thus, the 10% cocoa diet was produced by adding 100 g/Kg cocoa to AIN-93G; as a result, the cocoa diet was slightly richer in proteins (2.2%) and lipids (1.1%), but in order to make both diets isoenergetic, the content in carbohydrate was slightly reduced (4.2%). The composition of diets is given elsewhere (Cordero-Herrera et al., 2015).

2.3. Animals and diets

Eight male Zucker lean (ZL) rats and sixteen Zucker diabetic fatty [ZDF; *ZDF/crl-lepr* (fa/fa)] animals were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) at 9 weeks old. ZDF rats possess a mutation in the leptin receptor and spontaneously develop severe obesity, hyperglycaemia, hyperlipidaemia, and insulin resistance, and are widely used as a model for type 2 diabetes (Leonard, et al., 2005).

Animals were caged in groups under controlled conditions (19–23 °C, 50–60% humidity and 12 h light-dark cycles). After one week of acclimatization, ZDF rats were randomly assorted into two different experimental groups: one group received a standard diet (ZDF-C) and the other group was fed with the cocoa-rich diet (ZDF-Co). ZL rats remained as a unique group and were fed with the standard control diet. Both diets were isocaloric and all animals were provided with food and water *ad libitum*.

Food intake was monitored daily and animal weight was weekly followed. After 10 weeks, animals were fasted overnight and blood samples were collected for biochemical analysis; serum was separated by centrifugation at 1000g, 10 min, 4 °C for further biochemical analysis. Kidneys were collected, weighted and divided into two samples: one was fixed by immersion in paraformaldehyde (PFA) for histological analysis and the other sample was frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C. All animal protocols were approved by the Bioethical Committees from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid, Spain) and Universidad Complutense de Madrid (UCM, Madrid, Spain), and the regional Committee for Laboratory Animals Welfare (Comunidad de Madrid, Ref. number PROEX-304-15), and were treated according to Institutional Care Instructions (Bioethical Commissions from CSIC and UCM).

2.4. Biochemical analysis

Blood glucose was determined using an Accounted Glucose Analyser (LifeScan España, Madrid, Spain). Serum insulin was analysed with a rat insulin ELISA kit with a detection limit lower than 0.15 ng/mL. HbA1c was measured in blood using a latex turbidimetry kit following the manufacturer's instructions. The minimum detectable amount was 0.1%. Creatinine was analysed with a colorimetric kit following the manufacturer's instructions. Insulin sensitivity was estimated by the Homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) according to the following formula: [fasting glucose (mM) \times fasting insulin (mUI/L)]/22.5, and Homeostasis model assessment of insulin sensitivity (HOMA-IS) according to the following formula: [10,000/(fasting glucose (mg/dL) \times fasting insulin (ng/mL))].

Urine samples were collected over 24 h by placing the animals in metabolic cages. Urinary glucose and albumin were measured by the glucose oxidase method and a latex turbidimetry kit, respectively, following the manufacturer's instructions. The estimated glomerular filtration rate (eGFR, mL/min) was calculated according to the following formula: [(urine creatinine (mg/dL) × urine volume (mL/min))/serum creatinine (mg/dL)].

To quantify the renal glycogen content, frozen kidney samples were dissolved in 30% KOH, boiled and later centrifuged at 12,000 g for 5 min, and glycogen was measured in the supernatants. Glycogen content was measured using a commercial glycogen fluorometric kit (Cordero-Herrera et al., 2014).

2.5. Glucose tolerance test (GTT)

Overnight fasted rats were administered 35% glucose solution i.p. (2 g/Kg of body weight) and blood samples were obtained from the tail vein before the glucose load (t = 0) and at 15, 30, 60, 90 and 120 min after glucose administration. Blood glucose levels were measured with a glucometer (LifeScan). Overall changes in glucose during GTT were calculated as the area under the curve (AUC) above the basal levels.

2.6. Preparation of renal lysates

Samples of frozen kidney were homogenized 1:5 (w:v) in extraction buffer [50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 10% glycerol, 10 mM Na₂P₂O₇, 10 mM NaF, 2 mM EDTA, 1% Nonidet P-40, 2 mM Na₃VO₄, 5 µg/mL leupeptin, 20 µg/mL aprotinin, 2 mM benzamidin and 2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride]. Homogenates were centrifuged at 14,000 g for 60 min and the supernatants were collected, assayed for protein concentration by using the Bradford reagent and stored at –80 °C until use for Western blot analyses.

2.7. Western blot analysis

To detect p-(Tyr1150/1151)-IR, IR, GSK3, p-GSK3, GS, p-GS, PEPCK, G-6-Pase, SGLT-2 and GLUT-2, equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) filters (Millipore, Madrid, Spain). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare, Madrid, Spain) or anti-mouse (Sigma, Madrid, Spain) immunoglobulin. Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Normalization of Western blot was ensured by β-actin and band quantification was carried out with a Scanjet scanner (Hewlett Packard) and the Scion Image software.

2.8. Histological analysis

Left kidney was removed, fixed overnight in 4% PFA in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 and routinely paraffin embedded. Serial sections (4 µm) were mounted on glass slides, hydrated and stained with Haematoxylin and Eosin (H&E) or periodic-acid-Schiff (PAS),

respectively, according to the manufacturer's instructions. To evaluate the histopathological damage, images of stained sections were acquired with magnification at 200 × and/or 400 × using a digital camera (Leica DFC 320 camera, L'Hospitalet del Llobregat, Spain) attached to a light microscope (Leica DM LB2). Morphometric analysis was carried out with ImageJ v1.52j software (National Institutes of Health: rsb.info.nih.gov/ij) and the colour deconvolution plugin. All slides were examined by two different researchers in a blinded manner. The glomerular and tubular injuries were evaluated as following: glomerular tuft area (µm²) was defined by tracing the outline of the glomerular tuft as the region of interest (ROI); mesangial expansion was defined as periodic acid-Schiff-positive and nuclei-free area in the mesangial matrix fraction within the glomerular (%), Bowman's space (µm²) was calculated by subtracting the glomerular tuft area from the outline of each glomerulus; cortical tubular size representing the tubular dilatation was calculated by tracing the outline of each tubule (µm²); the tubular epithelial thickness was calculated by subtracting the measured by outlining the apical membrane from outlining each tubular profile (µm²); cortical hyaline cast area was calculated as the percentage of the cortex occupied by PAS-positive stain proteinaceous cast (µm²) by scoring 10 renal cortical tubules per kidney in randomly selected microscopic fields. All areas were calculated from the mean of 10 cortical fields for each kidney or 10 glomeruli cut at the vascular pole in each kidney.

2.9. Statistics

Prior to statistical analysis, data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene. For multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by the Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. The analysis was followed by a one-way ANOVA. In tables and figures, means not sharing a common superscript letter differ significantly at *P* < 0.05. A SPSS version 23.0 program has been used.

3. Results

3.1. Cocoa-rich diet improves body weight, serum glucose and insulin, and HbA1c levels in ZDF rats

Initial and final body weight, and total food intake were significantly higher in both groups of diabetic rats than in ZL animals (Table 1). Interestingly, the final body weight of animals fed with cocoa diet (ZDF-Co rats) was lower in comparison to ZDF-C group, although still higher than that of ZL group. Moreover, total food intake was lower in ZL rats than in ZDF-C and ZDF-Co animals (Table 1). Both groups of diabetic rats showed greater absolute kidney weight than ZL animals, which demonstrated the typical nephromegaly of the early stage of diabetes, although no differences were observed for the kidney-to body weight ratio among all groups (Table 1).

Glucose and insulin levels were higher in ZDF groups than in ZL rats, and those values were greater in ZDF-C animals than in ZDF-Co rats (Table 2). Additionally, HbA1c levels increased in both diabetic groups when compared to ZL rats, but ZDF-Co animals exhibited lower

Table 1

Body weight data, food intake and kidney weights of rats fed with standard (ZL and ZDF-C) and cocoa-rich (ZDF-Co) diets*.

	ZL	ZDF-C	ZDF-Co
Initial body weight (g)	228.00 ± 15.00 ^a	282.00 ± 11.00 ^b	282.00 ± 13.00 ^b
Final body weight (g)	329.00 ± 4.00 ^a	444.00 ± 8.00 ^c	409.00 ± 7.00 ^b
Body weight gain (g in 10 weeks)	101.00 ± 12.00 ^a	162.00 ± 9.00 ^c	127.00 ± 17.00 ^b
Total food intake (g in 10 weeks)	1239.00 ± 53.00 ^a	1875.00 ± 63.00 ^b	1872.00 ± 79.00 ^b
Kidney weight (g)	1.12 ± 0.11 ^a	1.56 ± 0.19 ^b	1.44 ± 0.11 ^b
Kidney-to body weight ratio (x 100)	0.34 ± 0.03 ^a	0.35 ± 0.04 ^a	0.35 ± 0.03 ^a

* Data represent the means ± SD. Means in a row not sharing a common superscript letter differ, *P* < 0.05.

Table 2

Biochemical parameters related to the metabolism and renal function of rats fed with standard (ZL and ZDF) and cocoa-rich (ZDF-Co) diets*.

	ZL	ZDF-C	ZDF-Co
Serum			
Glucose (mmol/L)	5.23 ± 0.14 ^a	13.82 ± 0.50 ^c	7.37 ± 0.28 ^b
Insulin (ng/mL)	0.41 ± 0.01 ^a	4.52 ± 0.19 ^c	1.25 ± 0.08 ^b
HbA1c (%)	4.40 ± 0.12 ^a	10.67 ± 0.58 ^c	6.10 ± 0.24 ^b
AUC glucose (mM/min)	1838.00 ± 80.00 ^a	4242.00 ± 566.00 ^c	3141.00 ± 205.00 ^b
HOMA-IR	2.67 ± 0.12 ^a	90.96 ± 14.25 ^c	12.71 ± 0.67 ^b
HOMA-IS	273.39 ± 22.22 ^c	7.95 ± 1.39 ^a	55.81 ± 2.98 ^b
Creatinine (mg/dL)	0.18 ± 0.01 ^a	0.26 ± 0.02 ^c	0.20 ± 0.02 ^b
Urine			
Glucose (mmol/24 h)	0.63 ± 0.07 ^a	67.95 ± 8.29 ^c	48.69 ± 6.38 ^b
Albumin (mg/24 h)	2.59 ± 0.52 ^a	46.40 ± 3.26 ^c	38.87 ± 1.76 ^b
eGFR (mL/min)	0.41 ± 0.06 ^a	0.98 ± 0.15 ^c	0.56 ± 0.05 ^b

* Data represent the means ± SD. Means in a row not sharing a common superscript letter differ, $P < 0.05$.

levels than those of ZDF-C rats.

All these results could suggest that cocoa-rich diet ameliorates hyperglycaemia and hyperinsulinaemia in ZDF rats.

3.2. Cocoa-rich diet improves glucose tolerance and insulin sensitivity in ZDF rats

To further evaluate the ameliorative effects of the cocoa intake on the diabetic phenotype, GTT was performed. ZDF-C group had impaired glucose tolerance with a higher glucose AUC compared with ZL rats, and the cocoa-rich diet improved the glucose tolerance in ZDF animals (Table 2). In concert, insulin resistance index (HOMA-IR index) increased in ZDF rats vs. ZL, but a significant decrease was observed in ZDF-Co animals in comparison to ZDF-C group (Table 2). Furthermore, insulin sensitivity index (HOMA-IS index) was reduced in both ZDF groups when compared to ZL rats, but ZDF-Co animals exhibited higher levels than those of ZDF-C rats (Table 2). Thus, it could be suggested that cocoa-rich diet alleviates glucose intolerance and insulin resistance of ZDF rats.

3.3. Cocoa-rich diet ameliorates renal dysfunction in ZDF rats

To continue with the evaluation of the effects of the cocoa-rich diet on the diabetic rats, serum and urinary parameters related to the renal function were evaluated. Serum creatinine was increased in diabetic rats in comparison to ZL animals, whereas declined in the rats fed with the cocoa-rich diet (ZDF-Co, Table 2), showing intermediate levels to those of their lean and diabetic littermates. Similarly, in urine both glucose and protein excretion decreased in ZDF-Co animals when compared to ZDF-C rats, although values were still higher than those of the ZL group (Table 2). In addition, eGFR, which showed enhanced levels in ZDF rats when compared to ZL animals, was improved in the ZDF-Co group, displaying lower values than ZDF-C animals, yet higher than those of ZL rats (Table 2). All these changes suggest that cocoa-rich diet might contribute to ameliorate the renal dysfunction in ZDF rats.

3.4. Cocoa-rich diet alleviates renal cortex glomerular and tubular hypertrophy in ZDF rats

Diabetic kidney disease is accompanied by clinical and morphological alterations (Forbes and Cooper, 2013; Persson and Rossing, 2018), and to get further insights into the potential structural changes, histological analyses were performed by H&E and PAS staining in renal cortex sections.

Lean control rats (ZL) demonstrated a normal architecture of the renal corpuscle and renal tubules (Fig. 1). In contrast, histopathological examination of the ZDF-C kidneys revealed a compensatory glomerular and tubular hypertrophy. In the glomeruli, increased glomerular tuft area, diffused mild mesangial matrix expansion and widening of

Bowman's space were observed in ZDF-C when compared to ZL and ZDF-Co groups (Fig. 1A–D). These early hypertrophic processes were restored to comparable values to those of ZL group when ZDF animals were fed with the cocoa-rich diet (Fig. 1A–D), demonstrating the reversion of the glomerular hypertrophy to non-diabetic values. In addition, in the renal tubules, ZDF-C rats presented hypertrophic tubular epithelium, dilatation of tubules, increased hyaline casts and accumulation of glycogen in the tubular epithelium (Fig. 1A, E–G). However, when compared to ZDF-C animals, ZDF-Co rats showed less-dilated tubules and a narrower tubular epithelium, which resulted in a smaller surface reabsorption (Fig. 1A, E and F). Similarly, the percentage of the area of hyaline cast pinkish amorphous protein within the tubular lumen of ZDF-Co kidney displayed intermediate values in comparison to their lean and diabetic littermates (Fig. 1A and G). Altogether it could indicate that cocoa intake could contribute to minimize the adverse morphological renal lesions in ZDF animals.

3.5. Cocoa-rich diet improves insulin signalling in ZDF rat's renal cortex

The role of the insulin signalling pathway in the kidney is thought to contribute to the maintenance of the renal glucose homeostasis (Alvarez-Cilleros et al., 2018; Artunc et al., 2016; Mitrakou, 2011; Rahmoune et al., 2005). In view of the obtained results, it was studied whether the cocoa-rich diet modulates the insulin signalling in the renal cortex, and total and phosphorylated levels of main proteins of this pathway were assayed by Western blot.

Tyrosine phosphorylated levels of IR, which are associated to an earlier response to insulin stimulation, were diminished in ZDF-C rats in comparison with ZDF-Co animals, which showed similar values to those of ZL group (Fig. 2A and B). However, there were no significant differences in the content of insulin receptor (IR) among all animal groups (Fig. 2A and B).

GSK3 is a rate-limiting enzyme in the glycogen synthesis (Mariappan et al., 2008). As shown in Fig. 3A and B, p-GSK3 decreased in ZDF-C rats when compared to ZL and ZDF-Co animals (Fig. 3A and B). In line with these results, ZDF-C animals presented increased p-GS levels that were restored to ZL values by the cocoa-rich diet in ZDF-Co rats (Fig. 3A and C). The contents of total GSK3 and GS in the renal cortex were not modified among groups. In addition, an increase in the renal glycogen content in ZDF-C rats was found, whereas ZDF-Co animals showed intermediate values to those of their lean and diabetic littermates (Figs. 1A and 3D). Altogether it suggests that the cocoa-rich diet prevents the blockage of the insulin signalling cascade observed in ZDF rats by modulating main proteins of the insulin pathway from the early steps of this route, contributing to the glucose homeostasis.

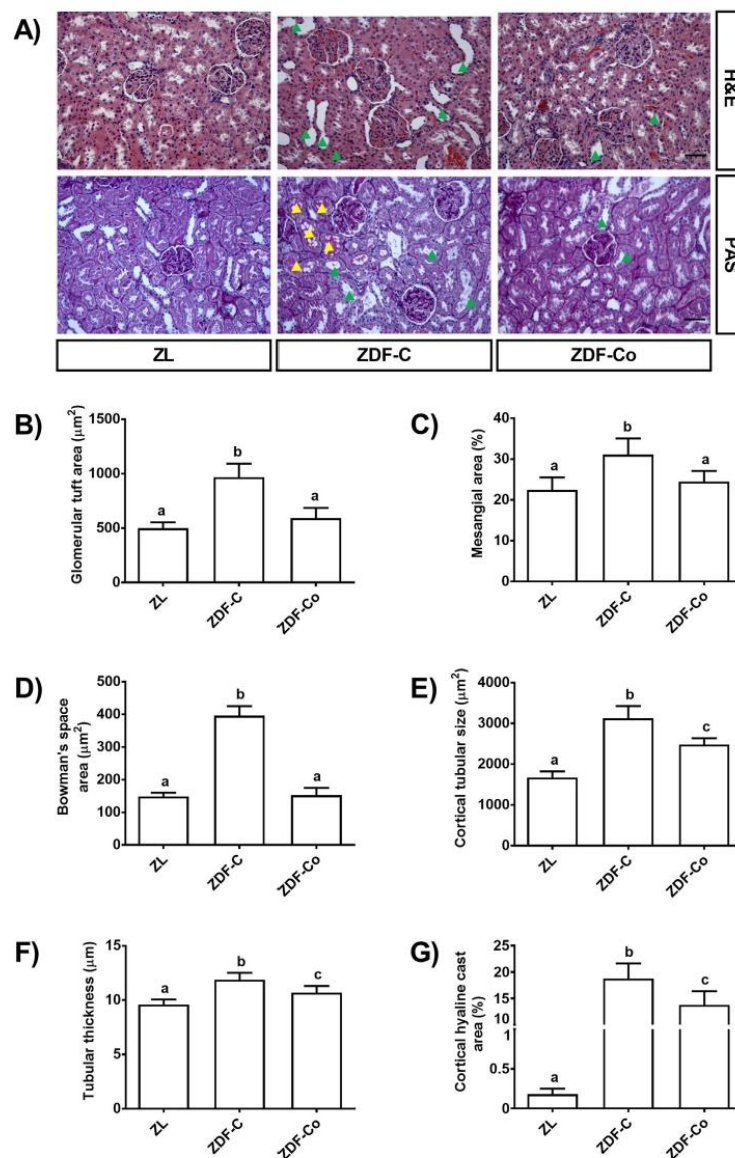


Fig. 1. Histological analyses of renal cortex in Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed with control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed with cocoa diet (ZDF-Co). (A) Representative sections of renal cortex stained with H&E and PAS (scale bar = 20 μm). Green arrowheads indicate dilated tubules. Yellow arrowheads indicate PAS-positive hyaline casts in distal tubules. (B) Glomerular tuft area. (C) Mesangial area. (D) Bowman's space area. (E) Cortical tubular area. (F) Cortical tubular thickness. (G) Cortical hyaline cast area. Data are shown as mean \pm SD, n = 6–8. Means not sharing a common letter differ significantly, $P < 0.05$. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

3.6. Cocoa-rich diet modulates rate-limiting proteins of gluconeogenesis and transport of glucose in the renal cortex of ZDF rats

In the diabetic renal cortex, an enhanced gluconeogenesis and glucose reabsorption have been reported at the early stage of the disease (Eid et al., 2006; Mitrakou, 2011). Thus, to continue with the study of the glucose homeostasis, key proteins involved in renal glucose production and transport, namely PEPCK, G-6-Pase, SGLT-2 and GLUT-2, were evaluated by Western blot in all animal groups.

PEPCK levels increased in the renal cortex of ZDF rats when compared to ZL animals, and this effect was partly reverted in animals receiving the cocoa rich-diet. In this line, values of G-6-Pase increased in ZDF-C animals in comparison to their lean littermates, whereas rats fed

with the cocoa-rich diet showed comparable levels of G-6-Pase to those of ZL group (Fig. 4A and B). Additionally, SGLT-2 and GLUT-2 levels were similar in ZL and ZDF-Co animals, but both proteins significantly increased their content in ZDF-C group (Fig. 5A–C). All this suggests that cocoa-rich diet might also contribute to preserve the renal functionality and modulate the glucose homeostasis in ZDF rats.

4. Discussion

Prevention and treatment of the diabetic kidney disease rely on tackling the broad cardiovascular and diabetic factors, being glucotoxicity a major player in this process (Forbes and Cooper, 2013; Persson and Rossing, 2018; Thomas et al., 2015). In this regard,

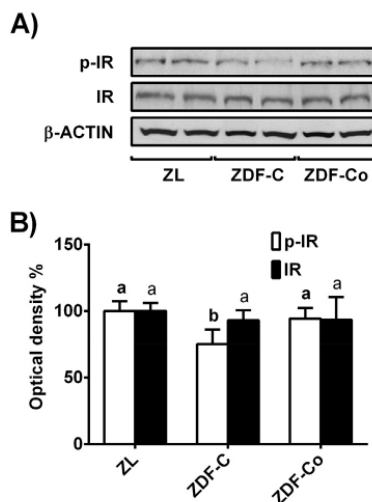


Fig. 2. Effect of the cocoa-rich diet on phosphorylated and total levels of IR in the renal cortex of ZDF rats. (A) Bands of representative experiments. (B) Densitometric quantification of p-IR (Tyr) and IR. Values are expressed as a percentage relative to ZL rats. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin ($n = 6-8$). Means not sharing a common letter differ ($P < 0.05$). Different styles of letters (bold and normal) have been used for each parameter (p-IR and IR levels, respectively) depicted within the same graph.

growing evidence suggests the anti-diabetic activity of cocoa by contributing to control glucose levels (Cordero-Herrera et al., 2015; Costa et al., 2017; Grassi et al., 2008; Jalil et al., 2008; Martín et al., 2016; Martín et al., 2017; Ruzaidi et al., 2005). However, insufficient studies have been performed at molecular level to support these observations, especially in the kidney, which has been proven to be a key organ for maintaining the glucose homeostasis (Mitrakou, 2011; Tiwari et al., 2007; Tiwari et al., 2013).

This work shows that a cocoa-rich diet improves glycaemic control

and insulin sensitivity in the renal cortex of ZDF rats. To the best of our knowledge, this is the first *in vivo* demonstration that a cocoa-rich diet alleviates the diabetic-induced cortical renal dysfunction by reverting the decrease of Tyr-IR phosphorylated levels, the inhibition of GSK3-GS pathway, and the increase of glucose transporters SGLT-2 and GLUT-2 values. Likewise, in the renal cortex, cocoa highly or totally reverts the levels of PEPCK and G-6-Pase to control values, respectively, and protects the renal functionality by restoring the glycogen content and the renal morphological changes.

Cocoa-rich diet decreased the body weight gain without influencing total food intake in comparison to ZDF-C group, as previously shown (Cordero-Herrera et al., 2015; Jalil et al., 2008; Ruzaidi et al., 2005). This effect has been related to the cocoa polyphenolic fraction and its ability to reduce fat adipose tissue. In this line, absolute kidney weights increased in the diabetic animals (nephromegaly), whereas kidney/body weight ratios were similar among all animal groups, indicating an early stage of the diabetic kidney disease (Baynes and Murray, 2009; Nakayama et al., 2010).

Diabetes is characterized by hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, glucose intolerance (AUC), insulin resistance (HOMA-IR), enhanced values of HbA1c, together with reduced insulin sensitivity (HOMA-IS) (Cordero-Herrera et al., 2015; Muthenna et al., 2014). All these metabolic alterations were observed in ZDF-C animals, which demonstrate their diabetic stage (Table 2). However, all these parameters were highly reverted to control values (ZL group) in rats receiving the cocoa-rich diet, indicating that cocoa improves glucose metabolism, as previously shown in diabetic rodents fed with cocoa, oligomeric cocoa procyanidins or different cocoa extracts (Cordero-Herrera et al., 2015; Dorenkott et al., 2014; Jalil et al., 2008; Ruzaidi et al., 2005). In addition, during diabetes there are usually changes in the renal structure and function, which have been mainly related to the glucotoxicity (Forbes and Cooper, 2013; Persson and Rossing, 2018). Indeed, the early diabetic kidney undergoes hyperfunction and hypertrophy (Forbes and Cooper, 2013). Thus, the hyperfiltration explains the high levels of serum creatinine, the presence of albumin and glucose in the urine (albuminuria and glycosuria, respectively) and therefore, the enhanced values of eGFR in ZDF-C rats (Table 2). Moreover, these clinical alterations were accompanied by morphological changes in the renal cortex associated to the hyperfiltration and mainly related to the

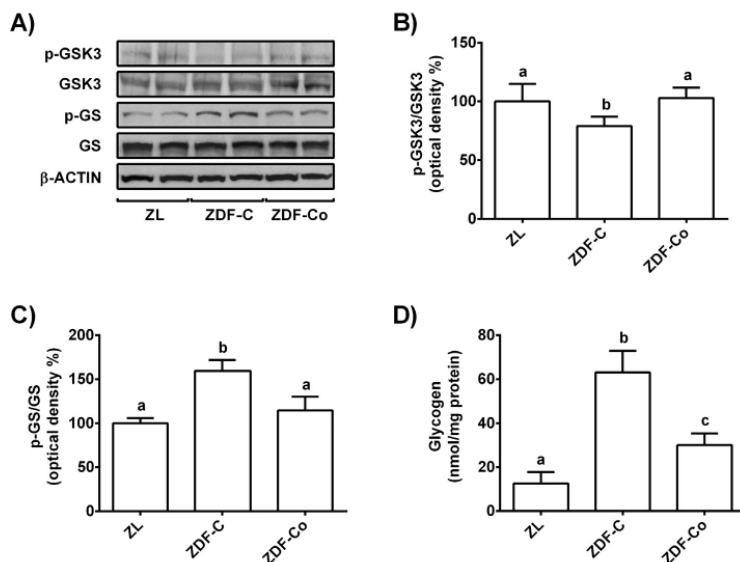


Fig. 3. Effect of the cocoa-rich diet on tyrosine phosphorylated and total levels of GSK3 β and GS, and glycogen content in the renal cortex of ZDF rats. (A) Bands of representative blots. Percentage data of (B) p-GSK3/GSK3 and (C) p-GS/GS ratios relative to ZL group. Values are expressed as means \pm SD, $n = 6-8$. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. (D) Glycogen content expressed as percent of control are means \pm SD of 6–8 different samples per animal group. Means not sharing a common letter differ ($P < 0.05$).

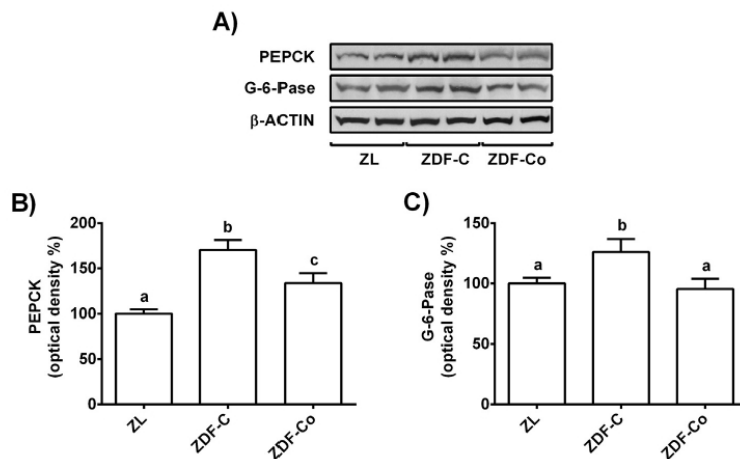


Fig. 4. Effect of the cocoa-rich diet on total levels of PEPCK and G-6-Pase in the renal cortex of ZDF rats. (A) Bands of representative experiments. Densitometric quantification of (B) PEPCK and (C) G-6-Pase. Values are expressed as a percentage relative to ZL animal group. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin ($n = 6-8$). Means not sharing a common letter differ ($P < 0.05$).

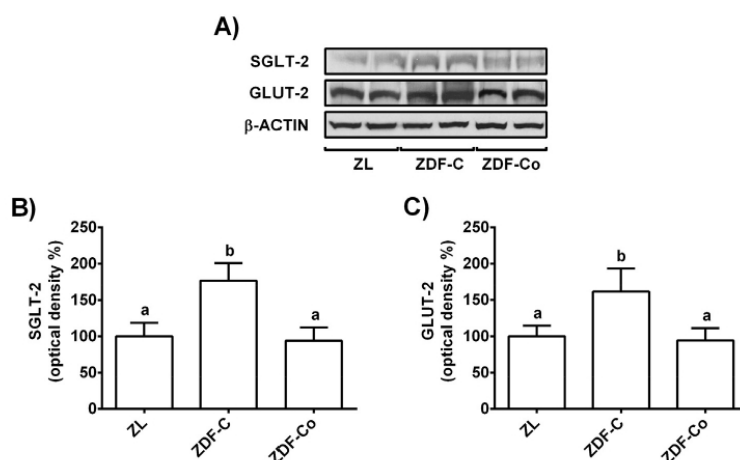


Fig. 5. Effect of the cocoa-rich diet on levels of SGLT-2 and GLUT-2 in the renal cortex of ZDF rats. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of (B) SGLT-2 and (C) GLUT-2 relative to ZL animals (means \pm SD, $n = 6-8$). Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Means not sharing a common letter differ significantly ($P < 0.05$).

high levels of glucose. Actually, histological kidney lesions in the ZDF-C rats observed in the present study are in agreement with an early stage of diabetes (classification criteria IIa, according to the classification system introduced by Renal Pathology Society) (Jain, 2012). Among these structural alterations, ZDF-C animals showed glomerular hypertrophy, mild mesangial matrix expansion and dilated Bowman's space, as well as tubular hypertrophy with increased tubular epithelium thickness, dilatation of the tubules, and increased hyaline casts formation (Fig. 1). All these hypertrophic changes have been connected to an augmented kidney weight, nephromegaly and elevation in serum creatinine (Cohen et al., 1996). Indeed, the degree of proteinuria displayed by diabetic rats is directly correlated with the hyaline droplet formation within the tubular lumen and, also reflects an enhanced protein reabsorption (Forbes and Cooper, 2013). It has also been reported that hyperfiltration related to glomerular injury is secondary to increased proximal tubular resorption of glucose (Hasegawa et al., 2013). Moreover, due to the growth of the tubule more filtrate is reabsorbed, which leads to increased GFR by a feedback-loop from the tubules (Forbes and Cooper, 2013). Thus, the compensatory functional and structural hypertrophy (glomeruli and associated tubules) showed in ZDF-C animals is a consequence of attempting to maintain filtration and reabsorption within the normal range during the early stage of

diabetes. Nevertheless, all these changes were reverted by feeding ZDF rats with cocoa (ZDF-Co). In agreement, in diabetic hypertensive rats administration of cocoa contributed to prevent the glomerular mesangial expansion (Papadimitriou et al., 2014). Similarly, foods rich in flavanols or pure flavanols, such as green tea, *Juglans regia* L. leaf powder, catechin, and procyanidin B2 from grape seed and cinnamon have demonstrated protective effects against high glucose-induced structural and functional alterations in kidneys of different diabetic rodent models (Mollica et al., 2017; Muthenna et al., 2014; Renno et al., 2008; Zhang et al., 2013; Zhu et al., 2014). All this supports the fact that most of renal alterations can be reversed at an early stage by a good glycaemic control (Thomas et al., 2015).

Renal tubules play a crucial role in the glucose homeostasis and their dysfunction constitutes an early pathophysiological alteration that correlates with an impaired renal function in the diabetic kidney disease (Forbes and Cooper, 2013; Mollica et al., 2017). Indeed, chronic hyperglycaemia, i.e. glucotoxicity, disrupts the glucose homeostasis, also in the kidney, and leads to the alteration of metabolic pathways, such as gluconeogenesis, glucose uptake and insulin signalling (Artunc et al., 2016; Mitrakou, 2011; Rahmoune et al., 2005). Thus, during a situation of chronic high levels of glucose the renal insulin signalling is impaired and the modulation of IR, which is essential for recruiting and

activating downstream pathways, is damaged, being diminished the phosphorylated levels of IR in particular tyrosine residues (Tiwarei et al., 2007), as shown in the present study. However, the cocoa-rich diet prevented this critical aspect for the development of insulin resistance in ZDF rats. In agreement with this, we have recently reported that epicatechin, the main flavanol of cocoa, attenuated insulin resistance by preventing the decrease of IR tyrosine phosphorylation induced by high levels of glucose in renal tubular NRK-52E cells (Álvarez-Cilleros et al., 2018). Similarly, the flavonoids quercetin and rutin alleviated insulin resistance by increasing IR tyrosine phosphorylation in the kidney of fructose-fed rats (Hu et al., 2012).

Following the insulin signalling route downstream, the activation of IR leads to the inhibition of GSK3, which subsequently phosphorylates and inactivates GS (Nystrom and Quon 1999). In this regard, GSK3 inhibition has been related to the amelioration of the injury induced by diabetes in kidneys (Mariappan et al., 2008). In agreement, the renal cortex of ZDF-C rats showed decreased p-GSK3, and increased GS phosphorylated levels, while enhanced glycogen content compared to ZL animals, as previously shown in the liver of ZDF animals (Cordero-Herrera et al., 2015; Leonard et al., 2005). These effects were highly reverted when animals were fed with the cocoa-rich diet. In line with these results, grape seed procyanidin B2 highly restored p-GSK3 levels to control values in the kidney of diabetic mice, and this was associated to a protective effect in the development of the diabetic nephropathy (Zhang et al., 2013). Similarly, in Zucker rats a specific GSK3 inhibitor enhanced oral glucose tolerance and insulin sensitivity (Dokken and Henriksen, 2006), and we have recently demonstrated that epicatechin improved insulin signalling-mediated GSK3 activation in high glucose-treated NRK-52E cells (Álvarez-Cilleros et al., 2018). Interestingly, administration of green tea prevented glycogen accumulation in the kidney tubules of diabetic rats (Renno et al., 2008). All together indicates that cocoa could improve renal insulin resistance and contribute to the glucose homeostasis by inhibiting GSK3 activation and preventing the enhanced glycogen content in the renal cortex of ZDF rats.

Renal gluconeogenesis occurs in the cortex, and also represents an important mechanism for the regulation of the glucose homeostasis (Mitrakou, 2011). Indeed, in the renal cortex of diabetic patients and rats enhanced levels of gluconeogenic PEPCK and G-6-Pase enzymes have been reported (Eid et al., 2006; Gatica et al., 2012; Tiwarei et al., 2013). Thus, downregulation of both enzymes, as observed in cocoa-fed ZDF rats when compared to ZDF-C group, could contribute to inhibit the renal gluconeogenesis, and then to diminish the glycaemia of diabetic animals, as previously shown for areca nut procyanidins, cinnamaldehyde, and vanadium compounds alone or in combination with *Trigonella foenum graecum* seed powder (Anand et al., 2010; Huang et al., 2013; Marzban et al., 2002; Mohamad et al., 2004). In this line, downregulation of IR in renal proximal tubule in insulin-resistant rats has been suggested to contribute to maintain high glucose levels through enhanced gluconeogenesis (Tiwarei et al., 2013). Therefore, all these results suggest that cocoa might also contribute to diminish the hyperglycaemia via the restoration of gluconeogenic PEPCK and G-6-Pase enzymes in ZDF rats, playing insulin signalling (IR) a physiological role in this process.

In the diabetic renal cortex, reabsorbed glucose by SGLT-2 is released into the circulation through GLUT-2, leading to upregulated levels of both transporters at the early stage of the disease, and contributing to worsen the situation of glucotoxicity and insulin resistance (Dion et al., 2017; Mitrakou, 2011). These alterations in glucose reabsorption influenced the glucose homeostasis, and led to the accumulation of glycogen in the renal tubules, among other changes (Mitrakou, 2011; Renno et al., 2008). In addition, albumin has also been reported to upregulate the expression of SGLT-2 in diabetes (Mitrakou, 2011). In agreement with all of the above, enhanced contents of SGLT-2 and GLUT-2 were detected in diabetic ZDF-C rats, whereas the transporter levels returned to control values (ZL group) in ZDF animals fed with cocoa. In this line, natural substances, such as

phlorizin and resveratrol contribute to restore SGLT-2 and GLUT-2 levels in diabetic rodents (Brouwers et al., 2013; Yonamine et al., 2016). In addition, the decreased proximal glucose reabsorption, as consequence of diminished SGLT-2 levels in ZDF-Co rats, might restore the normal tubulo-glomerular feedback mechanism, and contribute to reduce the glomerular hyperfiltration. Also, the inhibition of glucose reabsorption induced by cocoa might be able to attenuate the renal hypertrophy associated with the experimental diabetes. Therefore, the improved glucose homeostasis and insulin sensitivity of ZDF-Co animals could be associated to the modulatory effect of the cocoa-rich diet on SGLT-2 and GLUT-2 contents.

5. Conclusions

A cocoa-rich diet improves the glucose homeostasis and insulin resistance in ZDF rats. Cocoa alleviates high glucose levels through the restoration of renal glucose transporters (SGLT-2 and GLUT-2) levels and glycogen content, as well as through the modulation of key gluconeogenic enzymes, protecting the renal structure and functionality. Likewise, cocoa improves glucotoxicity-induced insulin resistance by increasing IR-Tyr phosphorylation and activating the GSK3/GS pathway. This study provides for the first time novel mechanistic insights into the preventive effects of cocoa on renal insulin resistance in a situation of glucotoxicity and, despite further efforts are needed, it could be suggested that cocoa might contribute to reduce the progression of renal disease in type 2 diabetic patients.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the grant AGL2015-67087-R (MINECO/FEDER, UE) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MINECO). D. Álvarez-Cilleros is a FPI fellow from the predoctoral program of MINECO (BES-2016-076721).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.002>.

References

- Álvarez-Cilleros, A., Martín, M.A., Ramos, S., 2018. Protective effects of (-)-epicatechin and the colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid against glucotoxicity-induced insulin signalling blockade and altered glucose uptake and production in renal tubular NRK-52E cells. *Food Chem. Toxicol.* 120, 119–128.
- Álvarez-Cilleros, D., Ramos, S., Goya, L., Martín, M.A., 2018. Colonic metabolites from flavanols stimulate nitric oxide production in human endothelial cells and protect against oxidative stress-induced toxicity and endothelial dysfunction. *Food Chem. Toxicol.* 115, 88–97.
- Anand, P., Murali, K.Y., Tandon, V., Murthy, P.S., Chandra, R., 2010. Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. *Chem. Biol. Interact.* 186, 72–81.
- Artunc, F., Schleicher, E., Weigert, C., Fritsche, A., Stefan, N., Häring, H.U., 2016. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nat. Rev. Nephrol.* 12, 721–737.
- Baynes, J., Murray, D.B., 2009. Cardiac and renal function are progressively impaired with aging in Zucker diabetic fatty type II diabetic rats. *Oxid Med Cell Longev* 2, 328–334.
- Brouwers, B., Pruniau, V.P., Cauwelier, E.J., Schuit, F., Lerut, E., Ectors, N., Declercq, J., Creemers, J.W., 2013. Phlorizin pretreatment reduces acute renal toxicity in a mouse model for diabetic nephropathy. *J. Biol. Chem.* 288, 27200–27207.
- Cohen, M.P., Clements, R.S., Cohen, J.A., Shearman, C.W., 1996. Prevention of decline in renal function in the diabetic db/db mouse. *Diabetologia* 39, 270–274.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Escrivá, F., Álvarez, C., Goya, L., Ramos, S., 2015. Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *J. Nutr. Biochem.* 26, 704–712.
- Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2014. Cocoa flavonoids attenuate

- high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food Chem. Toxicol.* 64, 10–19.
- Costa, C., Tsatsakis, A., Mamoulakis, C., Teodoro, M., Briguglio, G., Caruso, E., Tsoukalas, D., Margina, D., Dardiotis, E., Kouretas, D., Fenga, C., 2017. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food Chem. Toxicol.* 110, 286–299.
- Dion, F., Dumayne, C., Henley, N., Beauchemin, S., Arias, E.B., Leblond, F.A., Lesage, S., Lefrançois, S., Cartee, G.D., Pichette, V., 2017. Mechanism of insulin resistance in a rat model of kidney disease and the risk of developing type 2 diabetes. *PLoS One* 12, e0176650.
- Dokken, B.B., Henriksen, E.J., 2006. Chronic selective glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances glucose disposal and muscle insulin action in prediabetic obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 291, E207–E213.
- Dorenkott, M.R., Griffin, L.E., Goodrich, K.M., Thompson-Witrick, K.A., Fundaro, G., Ye, L., Stevens, J.R., Ali, M., O'Keefe, S.F., Hulver, M.W., Neilson, A.P., 2014. Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity compared to monomeric and polymeric cocoa procyanidins for preventing the development of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance during high-fat feeding. *J. Agric. Food Chem.* 62, 2216–2227.
- Eid, A., Bodin, S., Ferrier, B., Delage, H., Boghossian, M., Martin, M., Bavel, G., Conjard, A., 2006. Intrinsic gluconeogenesis is enhanced in renal proximal tubules of Zucker diabetic fatty rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 398–405.
- Forbes, J.M., Cooper, M.E., 2013. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol. Rev.* 93, 137–188.
- Gatica, R., Bertinat, R., Silva, P., Carpio, D., Ramírez, M.J., Slebe, J.C., San Martín, R., Nualart, F., Campistol, J.M., Caelles, C., Yáñez, A.J., 2012. Altered expression and localization of the insulin receptor in proximal tubule cells from human and rat diabetic kidney. *J. Cell. Biochem.* 114, 639–649.
- Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., Blumberg, J.B., Ferri, C., 2008. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J. Nutr.* 138, 1671–1676.
- Hasegawa, K., Wakino, S., Simic, P., Sakamaki, Y., Minakuchi, H., Fujimura, K., Hosoya, K., Komatsu, M., Kaneko, Y., Kanda, T., Kubota, E., Tokuyama, H., Hayashi, K., Guarente, L., Itoh, H., 2013. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. *Nat. Med.* 19, 1496–1504.
- Hu, Q.-H., Zhang, X., Pan, Y., Li, Y.-C., Kong, L.-D., 2012. Allopurinol, quercetin and rutin ameliorate renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation in fructose-fed rats. *Biochem. Pharmacol.* 84, 113–125.
- Huang, P.L., Chi, C.W., Liu, T.Y., 2013. Areca nut procyanidins ameliorate streptozocin-induced hyperglycemia by regulating gluconeogenesis. *Food Chem. Toxicol.* 55, 137–143.
- Igarashi, K., Honma, K., Yoshinari, O., Nanjo, F., Hara, Y., 2007. Effects of dietary catechins on glucose tolerance, blood pressure and oxidative status in Goto-Kakizaki rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 53, 496–500.
- Jain, M., 2012. Histopathological changes in diabetic kidney disease. *Clin. Queries: Nephrology* 102, 127–133.
- Jalil, A.-M.-M., Ismail, A., Pei, C.-P., Hamid, M., Kamaruddin, S.-H., 2008. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (ob-db) rats. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7877–7884.
- Kim, Y., Keogh, J.B., Clifton, P.M., 2016. Polyphenols and glycemic control. *Nutrients* 8, 17.
- Leonard, B.L., Watson, R.N., Loomes, K.M., Phillips, A.R.J., Cooper, G.J., 2005. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetol.* 42, 162–170.
- Mariappan, M.M., Shetty, M., Sataranatarajan, K., Choudhury, G.G., Kasinath, B.S., 2008. Glycogen synthase kinase 3 β is a novel regulator of high glucose- and high insulin-induced extracellular matrix protein synthesis in renal proximal tubular epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 283, 30566–30575.
- Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2016. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 1756–1769.
- Martín, M.A., Goya, L., Ramos, S., 2017. Protective effects of tea, red wine and cocoa in diabetes. Evidences from human studies. *Food Chem. Toxicol.* 109, 302–314.
- Martín, M.A., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A.B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., Goya, L., 2008. Protection of human HepG2 cells against oxidative stress by cocoa phenolic extract. *J. Agric. Food Chem.* 56, 7765–7772.
- Marzban, L., Rahimian, R., Brownsey, R.W., McNeill, J.H., 2002. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium(IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Endocrinology* 143, 4636–4645.
- Mitrakou, A., 2011. Kidney: its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 93S, S66–S72.
- Mohamad, S., Taha, A., Bamezai, R.N.K., Basir, S.F., Baquer, N.Z., 2004. Lower doses of vanadate in combination with trigonella restore altered carbohydrate metabolism and antioxidant status in alloxan-diabetic rats. *Clin. Chim. Acta* 342, 105–114.
- Mollica, A., Zengin, G., Locatelli, M., Stefanucci, A., Macedonio, G., Bellagamba, G., Onaolapo, O., Onaolapo, A., Azeez, F., Ayileka, A., Novellino, E., 2017. An assessment of the nutraceutical potential of Juglans regia L. leaf powder in diabetic rats. *Food Chem. Toxicol.* 107, 554–564.
- Muthenna, P., Raghu, G., Kumar, P.A., Surekha, M.V., Reddy, G.B., 2014. Effect of cinnamon and its procyanidin-B2 enriched fraction on diabetic nephropathy in rats. *Chem. Biol. Interact.* 222, 68–76.
- Nakayama, T., Kosugi, T., Gersch, M., Connor, T., Sanchez-Lozada, L.G., Lanasa, M.A., Roncal, C., Perez-Pozo, S.E., Johnson, R.J., Nakagawa, T., 2010. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 298, F712–F720.
- Nystrom, F.H., Quon, M.J., 1999. Insulin signalling: metabolic pathways and mechanisms for specificity. *Cell. Signal.* 11, 563–574.
- Papadimitriou, A., Peixoto, E.B.M.I., Silva, K.C., Lopes de Faria, J.M., Lopes de Faria, J.B., 2014. Increase in AMPK brought about by cocoa is renoprotective in experimental diabetes mellitus by reducing NOX4/TGF β -1 signaling. *J. Nutr. Biochem.* 25, 773–784.
- Persson, F., Rossing, P., 2018. Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and future perspective. *Kidney Int. Suppl.* 8, 2–7.
- Rahmoune, H., Thompson, P.W., Ward, J.M., Smith, C.D., Hong, G., Brown, J., 2005. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* 54, 3247–3254.
- Renno, W.M., Abdeen, S., Alkhalaf, M., Asfar, S., 2008. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *Br. J. Nutr.* 100, 652–659.
- Ruzaidi, A., Amin, I., Nawalyah, A.G., Hamid, M., Faizul, H.A., 2005. The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 98, 55–60.
- Thomas, M.C., Brownlee, M., Susztak, K., Sharma, K., Jandeleit-Dahm, K.A.M., Zoungas, S., Rossing, P., Groop, P.-H., Cooper, M.E., 2015. Diabetic kidney disease. *Nat Rev Disease Prim.* 15018. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.18>.
- Tiwari, S., Halagappa, V.K., Riaz, S., Hu, X., Ecelbarger, C.A., 2007. Reduced expression of insulin receptors in the kidneys of insulin-resistant rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 18, 2661–2671.
- Tiwari, S., Singh, R.S., Li, L., Tsukerman, S., Godbole, M., Pandey, G., Ecelbarger, C.M., 2013. Deletion of the insulin receptor in the proximal tubule promotes hyperglycemia. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24, 1209–1214.
- Vinson, J.A., Proch, J., Bose, P., Muchler, S., Taffera, P., Shutta, D., Samman, N., Agbor, G.A.C., 2006. Chocolate is a powerful ex vivo and in vitro antioxidant, antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *J. Agric. Food Chem.* 54, 8071–8076.
- Wang, J., Zhong, J., Yang, H.-C., Fogo, A.B., 2018. Cross talk from tubules to glomeruli. *Toxicol. Pathol.* 46, 944–948.
- Winocour, P.H., 2018. Diabetes and chronic kidney disease: an increasingly common multi-morbid disease in need of a paradigm shift in care. *Diabet. Med.* 35, 300–305.
- Yonamine, C.Y., Pinheiro-Machado, E., Michalini, M.L., Soares-Freitas, H., Okamoto, M.M., Corrêa-Giannella, M.L., Machado, U.F., 2016. Resveratrol improves glycemic control in insulin-treated diabetic rats: participation of the hepatic territory. *Nutr. Metab.* 13, 44. <https://doi.org/10.1186/s12986-016-0103-0>.
- Zhang, Z., Li, B.-Y., Li, X.-L., Cheng, M., Yu, F., Lu, W.-D., Cai, Q., Wang, J.-F., Zhou, R.-H., Gao, H.-Q., Shen, L., 2013. Proteomic analysis of kidney and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice indicate MFG-E8 as a key molecule in the development of diabetic nephropathy. *Biochem Biophys Acta* 1832, 805–813.
- Zhu, D., Wang, L., Zhou, Q., Yan, S., Li, Z., Sheng, J., Zhang, W., 2014. (+)-Catechin ameliorates diabetic nephropathy by trapping methylglyoxal in type 2 diabetic mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 2249–2260.

1.2.2. Artículo V.

El equilibrio redox, la autofagia y la apoptosis son procesos íntimamente relacionados con el desarrollo de la DN y cuya alteración contribuye al progreso de esta patología. Recientemente se ha demostrado que durante la DN se produce un aumento del estrés oxidativo junto con un incremento de la apoptosis y un descenso de la autofagia en las estructuras renales. En relación con estos procesos, la identificación de nuevos agentes capaces de modularlos constituye una estrategia muy interesante para la prevención o atenuación del daño renal en la DN. En este sentido, diferentes estudios sugieren que el cacao podría reducir el riesgo de padecer complicaciones diabéticas micro- y macrovasculares, ya que modula diferentes procesos celulares relacionados con el estrés oxidativo y la diabetes; sin embargo, los mecanismos moleculares responsables de esta posible actividad protectora actualmente se desconocen.

El objetivo de este estudio fue evaluar las propiedades antidiabéticas del cacao sobre el estado redox, la autofagia y la apoptosis en el córtex renal de las ratas ZDF. Para realizar estas investigaciones, desde la semana diez a la veinte de vida, las ratas macho ZL y ZDF-C se alimentaron con la dieta control, y otro grupo de animales ZDF recibió una dieta enriquecida en cacao al 10% (ZDF-Co). Posteriormente, para valorar el posible efecto protector de la dieta rica en cacao frente a los procesos relacionados con el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia, en homogenados de córtex renal se evaluaron los niveles de los ROS, de los carbonilos y algunas de las principales defensas antioxidantes (el GSH, la GPx, la GR, la SOD y la CAT), así como proteínas clave relacionadas con los procesos de estrés oxidativo (las MAPKs, el Nrf2, la SIRT-1 y la NOX-4), autofagia (la p62, la Beclina-1 y el LC3I/II), apoptosis (la AMPK, el mTOR, la Casp-3, la Casp-9, el Bax y el Bcl-x_L) y proliferación (el PCNA).

Estos estudios mostraron que las ratas diabéticas alimentadas con cacao mejoraron su función renal, así como la homeostasis glucídica, como se ha


mencionado anteriormente. Además, la dieta rica en cacao redujo el incremento del estrés oxidativo respecto a las ratas ZDF-C, ya que presentaron un descenso en los niveles de los ROS, de los grupos carbonilo, y en los valores fosforilados de las ERKs, así como de la NOX-4 en la corteza renal de las ratas diabéticas. El efecto modulador del cacao sobre el estado redox también parece estar mediado por la capacidad de este alimento para aumentar la actividad de las enzimas SOD y CAT, incrementar los niveles fosforilados del Nrf2 y de la AMPK, así como los niveles totales de la SIRT-1 en el córtex del riñón de las ratas diabéticas. Además, la ingesta de cacao en las ratas diabéticas atenuó el daño cortical renal mediante la activación de la autofagia (descenso de la expresión de la p62 e incremento de la expresión de la Beclina-1 y del LC3II) y la inhibición de la apoptosis (aumento de la expresión del Bcl-x_L y reducción de la expresión de la Casp-3, de la Casp-9 y del Bax).

En resumen, se podría concluir que la alimentación con una dieta rica en cacao atenuó el daño renal protegiendo del estrés oxidativo, estimulando la autofagia e inhibiendo la apoptosis en las ratas T2D.

La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por el apoyo en el cuidado y mantenimiento del modelo *in vivo*, así como por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: producción de los ROS, contenido de grupos carbonilos, WB y cuantificación de parámetros fisiológicos con kits comerciales. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.

Cite this: *Food Funct.*, 2019, **10**, 7926

Cocoa ameliorates renal injury in Zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress, apoptosis and inactivation of autophagy

David Álvarez-Cilleros,^a María Elvira López-Oliva,^b María Ángeles Martín^{a,c} and Sonia Ramos ^{*a}

Redox balance, autophagy and apoptosis are main processes involved in the development of diabetic nephropathy. Epidemiological and animal studies suggest that cocoa might reduce the risk of diabetic complications. However, the molecular mechanisms responsible for these potential preventive activities and whether cocoa exerts beneficial effects on dysregulated signalling pathways involved in cellular anti-oxidant defence, autophagy and apoptosis in the diabetic kidney remain largely unknown. Therefore, this work investigated the effect of a cocoa-rich diet on the mentioned processes in the renal cortex of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats. Male ZDF rats were fed either a control or cocoa-rich diet (10%), and Zucker lean animals received the control diet (10–20 weeks-of-life). ZDF rats fed with cocoa decreased body weight and glucose and insulin levels, and improved renal function. Cocoa intake further prevented the enhanced renal cortical oxidative stress in diabetic rats by regulating the antioxidant defence system and close-related proteins to cytoprotection and cell response; thus, cocoa diminished oxidative markers (reactive oxygen species and carbonyl groups) and NADPH-oxidase-4 levels, and restored key enzymatic antioxidant activities (superoxide dismutase and catalase), nuclear-erythroid-2-related factor-2, and ERK-MAPK levels, as well as sirtuin-1/5'-AMP-activated-protein kinase signalling. Moreover, in ZDF rats cocoa-rich diet contributed to alleviation of the renal cortical injury through autophagy activation (p62 upregulation, and downregulation of beclin-1 and LC3), and inhibition of apoptosis (Bcl-x_L stimulation and suppression of Bax and caspases-9 and -3). These findings provide the first *in vivo* evidence on the molecular mechanisms of cocoa to circumvent renal cortical damage that involve improvement of antioxidant competences, stimulation of autophagy and suppression of apoptosis in ZDF rats.

Received 7th August 2019,
Accepted 28th October 2019
DOI: 10.1039/c9fo01806a
rsc.li/food-function

Open Access Article. Published on 29 October 2019. Downloaded on 12/16/2019 8:18:13 AM.
This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0 Unported Licence.



1. Introduction

Diabetes often leads to other complications, and among them the diabetic kidney disease constitutes one of the main causes of death in diabetic patients.¹ In the diabetic kidney disease, at the earliest stage renal hyperfunction and hypertrophy are present, but later a persistent albuminuria and a progressive decline in the glomerular filtration rate appear.² Interestingly, one third of patients with diabetic kidney disease have marked tubular lesions and minimal glomerular alterations.² However,

in this disease the role of the glomerulus has typically been examined in contrast to the tubular compartment, which has been scarcely studied although it is earlier altered than glomeruli, as recently shown in ref. 2,3.

In diabetes, numerous underlying pathophysiological mechanisms have been described, but it is becoming clear that in this complicated metabolic disorder the increased oxidative stress, which is accompanied by augmented production of free radicals and/or impaired antioxidant defences, plays a central role in the development and progression of this disease.⁴ Consequently, inadequate responses related to the systemic enzymatic and non-enzymatic antioxidant defences, including glutathione (GSH), and the enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT), have been reported in diabetic patients.^{5,6} In this context, the redox-sensitive transcription nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), among others, constitutes a key protein for modulating the anti-oxidant response.⁷

^aDepartment of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science and Technology and Nutrition (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040 Madrid, Spain.

E-mail: s.ramos@ictan.csic.es; Fax: +34 91 549 36 27; Tel: +34 91 544 56 07

^bSección Departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Spain

^cCentro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Spain



Persistent oxidative stress due to the chronic hyperglycaemia also contributes to the early tubular injury and to the progression of the diabetic kidney disease,⁴ NADPH oxidases (NOX) being major sources of radical oxygen species (ROS) in this disease.⁸ In addition, oxidative stress results in the dysregulation of numerous cellular signalling pathways involved in cell response to the insult [mitogen-activated protein kinases (MAPKs), sirtuin-1 (SIRT-1), 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK), mammalian target of rapamycin (mTOR)], apoptosis (Bcl-2 family proteins, caspases), and autophagy (beclin-1, p62, LC3), among others.^{7,9,10} Consequently, antioxidant therapies aimed to prevent the oxidative stress and the dysregulation of close-related processes (apoptosis, autophagy) might constitute a promising approach in the diabetic kidney disease.

Cocoa is a rich source of antioxidant compounds, mainly flavanols (epicatechin and procyanidins), and it is accepted as a powerful antioxidant food.^{11–13} Different studies have also demonstrated that cocoa exerts antidiabetic effects related to the improvement of glucose tolerance and insulin sensitivity in diverse tissues on several animal models of diabetes and in humans.^{14–17} In addition, it has been reported that main cocoa flavanols, such as procyanidin B2, exert renoprotective effects in diabetes by preserving the organ functionality and morphology.¹⁸ In view of all this, it could be suggested that cocoa might modulate in the tubular compartment crucial processes involved in the development of the diabetic kidney disease, such as oxidative stress, autophagy and apoptosis. However to the best of our knowledge, the potential antidiabetic effect of cocoa related to the modulation of the mentioned key processes in the kidney in an *in vivo* model of type 2 diabetes remains to be evaluated. Therefore, this study was aimed at investigating the potential protective effect of a cocoa-rich diet on the redox status, autophagy and apoptosis, and exploring the underlying molecular mechanisms in the renal cortex of male Zucker diabetic fatty [ZDF; *ZDF/crl-lepr* (fa/fa)] rats.

2 Materials and methods

2.1. Materials and chemicals

Glutathione reductase (GR), reduced and oxidized glutathione (GSH and GSSG, respectively), nicotine adenine dinucleotide reduced salt (NADH), nicotine adenine dinucleotide phosphate reduced salt (NADPH), *tert*-butylhydroperoxide (*t*-BOOH), *o*-phthalaldehyde (OPT), dichlorofluorescein (DCFH), dinitrophenylhydrazine (DNPH), 3,3'-diaminobenzidine (DAB), hydrogen peroxide, proteinase K, and a SOD determination kit were purchased from Sigma Chemicals (Madrid, Spain). A rat insulin ELISA kit was obtained from Mercodia (AD Bioinstruments, Barcelona, Spain). An albumin kit was purchased from Spinreact (BioAnalitica, Madrid, Spain), and uric acid and creatinine kits were from Linear Chemicals S.L. (Barcelona, Spain). Anti-ERK1/2 and antiphospho-ERK1/2 recognizing phosphorylated Thr202/Thy204 of ERK1/2, anti-JNK1/2 and antiphospho-JNK1/2 recognizing phosphorylated

Thr183/Tyr185 of JNK1/2, anti-phospho-Thr180/Tyr182-p38, anti-active cleaved caspase-3, anti-active cleaved caspase-9, anti-AMPK and anti-phospho-Thr172-AMPK, anti-phospho-Ser2448-mTOR, and anti- β -actin were obtained from Cell Signalling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-p38 α (sc-535), anti-NOX-4 (sc-30141), anti-Bcl-x (sc-634), anti-Bax (sc-526), anti-p62 (sc-48389), anti-beclin-1 (sc-48341), anti-LC3 (sc-398822), and anti-SIRT-1 (sc-74465) were purchased from Santa Cruz (Qimigen, Madrid, Spain). Anti-phospho-Ser40-Nrf2 was obtained from Signalway antibody (Quimigen, Madrid, Spain), and anti-mTOR was purchased from Upstate (Izasa, Madrid, Spain). Anti-PCNA Ab-1 was from Lab Vision Corporation (Bionova científica S.L. Madrid, Spain). Terminal Transferase recombinant was purchased from Roche Applied Science (Roche Diagnostic, GmbH, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis and Bradford reagent were from BioRad Laboratories S.A. (Madrid, Spain).

2.2. Cocoa

Natural Forastero cocoa powder (a kind gift from Idilia S.L., Barcelona, Spain) was used for this study. A detailed description of this cocoa is given elsewhere.^{14,19} Diets were prepared from an AIN-93G formulation (Panlab S.L., Barcelona, Spain) and provide all nutrients required by adult rats. The 10% cocoa diet was produced by adding 100 g kg⁻¹ cocoa to AIN-93G at the expense of starch and cellulose. As a result, the cocoa diet was slightly richer in proteins (2.2%) and lipids (1.1%) but slightly inferior in carbohydrate (4.2%), to make both diets isocaloric (3612 kcal kg⁻¹ diet). The rationale to select this cocoa dose is based on previous studies in which beneficial effects, also against diabetes, have been shown.^{14,19,20} The composition of the diets is given in Table 1.

2.3. Animals and diets

Nine week-old male Zucker lean (ZL, *n* = 8) and Zucker diabetic ZDF/*crl-lepr* fa (*n* = 16) rats were purchased from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France). These animals possess a mutation in the leptin receptor and spontaneously develop severe obesity, hyperglycaemia, hyperlipidaemia, and insulin resistance, being widely used as an animal model that mimics human type 2 diabetes.²¹ The rationale to select the duration

Table 1 Composition of the experimental control and cocoa-rich diets

Components (g per kg dry weight)	Control	Cocoa
Casein	140	140
Dextrose	155	155
Sucrose	100	100
Fat	40	40
<i>tert</i> -Butylhydroquinone	0.008	0.008
Mineral mix.	35	35
Vitamin mix.	10	10
<i>l</i> -Cys	1.8	1.8
Cholin bitartrate	2.5	2.5
Cellulose	100	66
Starch	415.7	349.7
Cocoa powder	—	100



of the treatment is based on previous studies focused on renal pathophysiology;²² thus, in 9 week-old rats renal alterations could be slightly noticed (pre-diabetic animals), whereas an intermediate stage of the diabetic kidney disease that can still be reverted is observed in 20 week-old ZDF rats.²² Rats were housed (in pairs) in cages in a controlled environment (19–23 °C, 50–60% humidity and 12 h light–dark cycles). After one week of acclimatization, ZDF rats were randomly assorted into two different experimental groups: one group received a standard diet (ZDF-C) and the other one was fed with the cocoa-supplemented diet (ZDF-Co). ZL rats remained as a unique group and were fed with the standard control diet. All experimental groups were provided with food and water *ad libitum*. All animal protocols were approved by the Bioethical Committees from Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC, Madrid, Spain) and Universidad Complutense de Madrid (UCM, Madrid, Spain), and the regional Committee for Laboratory Animals Welfare (Comunidad de Madrid, Ref. number PROEX-304-15), and all the animals were treated according to the European (2010/63/EU) and Spanish (RD 53/2013) legislation on Care and Use of Experimental Animals.

Food intake was monitored daily and animal weight was weekly measured. At 20 weeks of age, rats were fasted overnight and sacrificed. Blood samples were collected and allowed to clot for 1 h and serum was separated by centrifugation at 1000g, 10 min, 4 °C for further biochemical analysis. Kidneys were collected and divided into two samples: one was fixed by immersion in paraformaldehyde (PFA) for immunohistochemical analysis and the other sample was frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C.

2.4. Biochemical analysis

Blood glucose was weekly determined using an Accounted Glucose Analyzer (LifeScan, Madrid, Spain). Serum insulin was analysed with a rat insulin ELISA kit with a detection limit lower than 0.15 ng mL^{–1}. Uric acid was evaluated with a colorimetric kit following the manufacturer's instructions.

Urine samples were collected over 24 h by placing the animals in metabolic cages three days before the end of the study. Animals had free access to food and water. Urine samples were collected in ice-cold bottles and centrifuged at 1000g for 10 min at 4 °C. Then, the supernatants were collected and stored at –80 °C until assayed. Urinary albumin and creatinine were measured by latex turbidimetry and using colorimetric kits, respectively, following the manufacturer's instructions. The estimated creatinine clearance per body weight was calculated according to the following formula: urinary creatinine (mg dL^{–1}) × urinary volume (mL d^{–1})/serum creatinine (mg dL^{–1}) × (1000/body weight (g)) × (1/1440 (min)).

2.5. Determination of ROS and protein carbonyl groups

ROS were quantified as described based on the oxidation of DCFH assay to dichlorofluorescein (DCF) that emits fluorescence.¹⁹ Briefly, renal cortex homogenates were diluted 1 : 20 (v/v) with ice-cold Locke's buffer [154 mM NaCl, 5.6 mM

KCl, 3.6 mM NaHCO₃, 2 mM CaCl₂, 10 mM D-glucose and 5 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.4] and incubated with 5 μM DCFH for 30 min at 37 °C. Fluorescence was measured in a microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT) at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm.

Protein oxidation of cortical renal homogenates was measured as carbonyl group content, as previously described in ref. 19. Samples of the frozen renal cortex were homogenized (1 : 5, w/v) in 0.25 M Tris (pH 7.4), 0.2 M sucrose and 5 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) buffer. Absorbance was measured at 360 nm and carbonyl content was expressed as nmol mg^{–1} protein using an extinction coefficient of 22 000 nmol L^{–1} cm^{–1}. Protein was measured by using the Bradford reagent.

2.6. Analysis of GSH content, and GPx, GR, CAT and SOD activities

GSH content was quantitated by Hissin and Hilf fluorimetric assay, as previously described in ref. 19. The renal cortex was homogenized (1 : 20, w/v) in 50 mM phosphate buffer pH 7.0, and proteins were precipitated with 5% trichloroacetic acid and then centrifuged for 30 min at 10 000g. The method is based on the reaction of GSH with OPT at pH 8.0 and fluorescence was measured at an excitation wavelength of 340 nm and an emission wavelength of 460 nm. The results of samples were referred to those of a standard curve of GSH (5 ng–1 μg).

For analysing the activity of antioxidant enzymes (GPx, GR, CAT, and SOD), samples of the frozen renal cortex were homogenized (1 : 5, w/v) in 0.25 M Tris, 0.2 M sucrose and 5 mM DTT buffer pH 7.4 and centrifuged at 3000g for 15 min. Determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using *t*-BOOH as a substrate, coupled to the disappearance of NADPH by GR.^{19,23} GR activity was assayed by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADPH utilised in the reduction of oxidized glutathione.^{19,23} CAT activity was determined by the decomposition of H₂O₂ as a decrease in absorbance at 240 nm.^{19,23} SOD activity was assayed by using a commercial kit following the manufacturer's instructions.^{19,23} The assay is based on the capacity of SOD to reduce superoxide anions, coupled with the disappearance of Dojindo's highly water-soluble tetrazolium salt (WST-1) to yield a dye. SOD activity was quantified by measuring the decrease in the absorbance at 440 nm. Protein concentration was measured by using the Bradford reagent.

2.7. Preparation of total cell lysates and western blot analysis

For protein detection (ERK, p-ERK, JNK, p-JNK, p38, p-p38, NOX-4, AMPK, p-AMPK, mTOR, p62, Beclin-1, LC3, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, Bcl-x_L and Bax), samples of the frozen renal cortex were lysed (1 : 5, w/v) at 4 °C in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 0.1% Triton X-100, 200 mM β-glycerolphosphate, 0.1 mM Na₃VO₄, 2 μg mL^{–1} leupeptin and 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), and later centrifuged at 14 000g for 1 h. Supernatants

were collected, assayed for protein concentration by using the Bradford reagent, aliquoted and stored at -80°C until used for western blot analyses.

Equal amounts of proteins were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to polyvinylidene difluoride filters (Merck, Madrid, Spain). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated anti-rabbit (GE Healthcare) or anti-mouse (Sigma) immunoglobulin. Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare). Normalization of western blot was ensured by β -actin and band quantification was carried out with a scanner and the Scion Image software.

2.8. Immunohistochemical analyses

Left kidneys were fixed in paraformaldehyde (4%), embedded in paraffin, and cut into $4\text{ }\mu\text{m}$ -thick sections. Serial renal cortical sections were incubated with the primary antibodies (PCNA, p-Nrf2, p-mTOR, or SIRT-1) overnight at 4°C , and then with HRP-conjugated secondary antibody and revealed with the DAB substrate as the chromogen and haematoxylin. Images of sections were acquired with magnification at $200\times$ and/or $400\times$ using a digital camera (Leica DFC 320 camera, L' Hospitalet del Llobregat, Spain) attached to a light microscope (Leica DM LB2). The proliferating cell nuclear antigen labelling index (PCNA-LI) and the percent of p-Nrf2 immunopositive nuclei were calculated as the percentage of positive nuclei related to total nuclei. SIRT1 and p-mTOR expressions were evaluated by calculating the percentage of their staining area with ImageJ v1.52j software (National Institutes of Health: rsb.info.nih.gov/ij) and the colour deconvolution plug-in. At least six sections per group were analysed. All slides were examined by two different researchers in a blinded manner. All areas were calculated from the mean of 10 cortical fields for each kidney.

2.9. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) assay

Apoptotic tubular cells were detected using the terminal transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) procedure. Tissue sec-

tions after deparaffinization and rehydration were permeabilised with proteinase K ($20\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) for 15 min at 37°C , and treated with 3% H_2O_2 for 5 min to quench endogenous peroxidase activity. After thorough washing with phosphate buffer, sections were incubated with equilibration buffer for 10 min, followed by immediate application of TdT-enzyme working for 1 h at 37°C in a humidity chamber. The reaction was stopped and the incorporated biotinylated nucleotides were detected by peroxidase conjugated streptavidin and subsequent staining with DAB and counterstaining with methyl green. The apoptotic index represents the proportion of cells undergoing apoptosis within a field divided by the number of total cells multiplied by 100 ($400\times$). For each animal, the total number of apoptotic cells and the total number of cells/field were determined in 50 cortical fields for each kidney of each animal.

2.10. Statistics

Prior to statistical analysis, data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene. For multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by the Tukey test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. $P < 0.05$ was considered significant. An SPSS version 25.0 program has been used.

3. Results

3.1. Cocoa-enriched diet improves body weight, and metabolic and renal functionality parameters

The final body weight and total food intake were increased in both groups of ZDF rats in comparison with ZL animals (Table 2). Interestingly, initial body weight was similar in both diabetic animal groups, yet higher than that in ZL rats. However, the final body weight of animals fed with cocoa diet (ZDF-Co) was reduced as compared to ZDF-C rats although total food intake and total energy intakes were similar in both ZDF groups. Moreover, ZDF rats showed higher levels of initial and final glycaemia, as well as final insulinaemia than ZL animals. Values for both parameters (glycaemia and insulinaemia) were lower in ZDF-Co rats than in the ZDF-C group at the end of the study although the initial values of glycaemia were

Table 2 Body weight, food intake, and biochemical parameters related to the metabolism and renal function of rats fed with standard (ZL and ZDF) and cocoa-rich (ZDF-Co) diets^a

	ZL	ZDF-C	ZDF-Co
Initial body weight (g)	210.00 ± 9.00^a	284.00 ± 10.00^b	285.00 ± 11.00^b
Final body weight (g)	333.00 ± 9.00^a	464.00 ± 12.00^c	406.00 ± 9.00^b
Total food intake (g in 10 weeks per cage)	2446.00 ± 136.00^a	3678.00 ± 165.00^b	3745.00 ± 178.00^b
Total energy intake (kcal in 10 weeks per cage)	8834.00 ± 489.00^a	$13\,286.00 \pm 597.00^b$	$13\,526.00 \pm 642.00^b$
Initial glycaemia (mg dL^{-1})	84.00 ± 6.00^a	105.00 ± 8.00^b	102.00 ± 13.00^b
Final glycaemia (mg dL^{-1})	92.40 ± 4.80^a	272.00 ± 20.74^c	132.82 ± 5.15^b
Final insulinaemia ($\mu\text{U mL}^{-1}$)	11.43 ± 0.74^a	125.14 ± 16.14^c	35.75 ± 5.53^b
Serum uric acid (mg dL^{-1})	1.14 ± 0.01^a	2.36 ± 0.18^c	1.81 ± 0.14^b
Creatinine clearance/body weight (mL per min per Kg)	5.50 ± 0.26^a	10.57 ± 1.48^c	6.42 ± 0.56^b
Urinary albumin/creatinine ratio (ACR, mg g^{-1})	51.25 ± 12.29^a	361.52 ± 25.45^c	297.19 ± 15.12^b

^a Data represent the means \pm SD. Means in a row without a common letter differ, $P < 0.05$.



similar in both groups of diabetic animals (Table 2). Likewise, cocoa-enriched diet reduced serum uric acid levels, and maintained lower values for this parameter in comparison with ZDF-C rats yet higher than ZL animals. In addition, both creatinine clearance and the urinary albumin/creatinine ratio (ACR), which showed enhanced levels in ZDF rats when compared to ZL animals, were improved in the ZDF-Co group, displaying intermediate values to those of lean and diabetic rats (Table 2). All these results could suggest that the cocoa-rich diet partly alleviates hyperglycaemia and hyperinsulinemia, and might contribute to amelioration of the renal dysfunction in ZDF rats.

3.2. Cocoa-rich diet averts enhanced ROS levels, protein oxidation and NOX-4 protein values in the renal cortex of ZDF rats

Chronic hyperglycaemia results in oxidative stress and increased ROS production in diabetes, which could lead to an enhanced macromolecule oxidation.^{4,7,8} In this line, NOX-4 is reported to be the major source of ROS in the kidneys during the diabetic kidney disease.⁸ Therefore, to study whether cocoa could prevent these processes, ROS and protein carbonyl content, as well as NOX-4 levels, were measured in the renal cortex of all animals.

ROS values and protein carbonyl content were increased in ZDF-C animals when compared to ZL and ZDF-Co rats, whereas both parameters were similar in ZL and ZDF-Co rats

(Fig. 1A and B). In concert, NOX-4 levels were enhanced in ZDF-C rats when compared to ZL animals, but this effect was partially repressed in animals receiving the cocoa rich-diet (Fig. 1C and D). Altogether it suggests that cocoa could contribute to improvement of the redox status as it reduced NOX-4 values, ROS generation and protein oxidation in the renal cortex of ZDF rats.

3.3. Cocoa-enriched diet modulates antioxidant defences in the renal cortex of ZDF rats

In order to continue studying the redox status of the renal cortex in ZDF diabetic rats, GSH levels, key antioxidant enzymatic activities, and the phosphorylated levels of the transcription factor Nrf2, which is a redox sensor that plays a main role in counteracting the oxidative stress,⁷ were analysed.

As shown in Fig. 2A, GSH content and GPx and GR activities were not modified in any group of rats. However, SOD and CAT activities diminished in ZDF-C rats when compared to the lean group, although both enzymatic activities were restored to ZL values by feeding the animals with the cocoa-rich diet (Fig. 2B). In concert, ZDF-C rats showed the lowest levels of nuclear p-Nrf2 of the three groups of animals, whereas ZDF-Co exhibited higher nuclear p-Nrf2 values than those of ZL rats (Fig. 2C). Interestingly, p-Nrf2 was localized in the tubules in all groups of animals. All these results might indicate that cocoa-enriched diet modulates relevant antioxidant defences in the renal cortex of ZDF rats, which

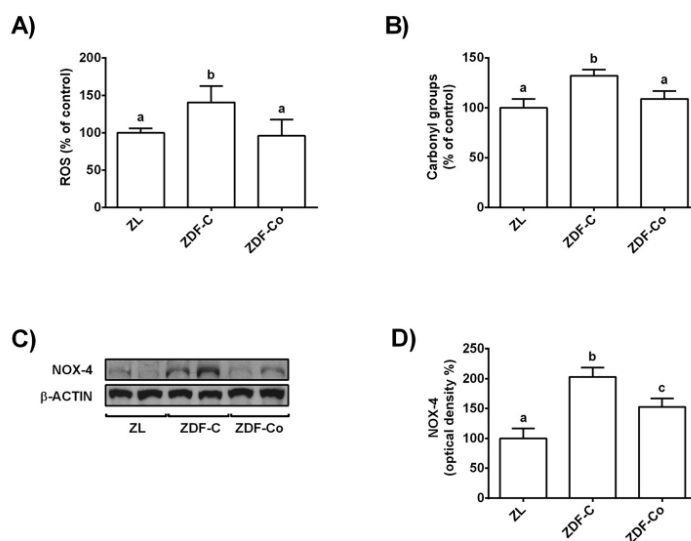


Fig. 1 Effect of the cocoa-enriched diet on (A) ROS production, (B) carbonyl groups and NOX-4 levels in the renal cortex of ZDF rats. (C) NOX-4 bands of representative experiments. (D) Densitometric quantification of total levels NOX-4. All values are expressed as percentage relative to the control condition. Equal loading of Western blots was ensured by β -actin. Means (means \pm SD, $n = 6-8$) without a common letter differ ($P < 0.05$).

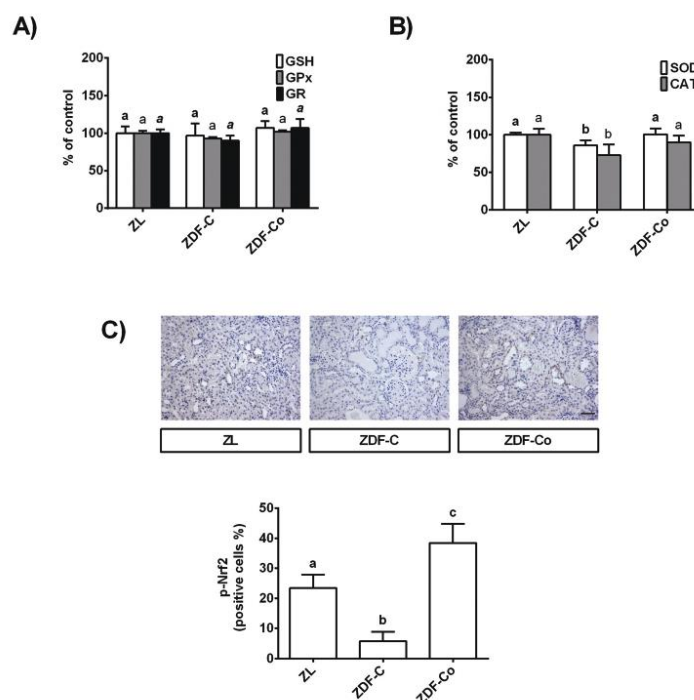


Fig. 2 Effect of the cocoa-rich diet on (A) GSH content and the activity of antioxidant enzymes GPx and GR, and (B) SOD and CAT in the renal cortex of ZDF rats. Values are expressed as a percentage relative to ZL rats (means \pm SD, $n = 7-9$). Different letters over a bar of the same parameter indicate statistically significant differences ($P < 0.05$). Different styles of letters (bold, plain and italics) have been used for each parameter depicted within the same graph. (C) Representative sections of the renal cortex for immunohistochemical staining of p-Nrf2 (brown-stained). p-Nrf2 is expressed as percentage of positive cells relative to total nuclei in the renal cortex. Scale bar: 20 μ m. Data represent means \pm SD of 6–8 samples per condition. Means without a common letter differ ($P < 0.05$).

might contribute to counteracting the oxidative stress in the diabetic animals.

3.4. Cocoa-rich diet regulates MAPK signalling in the renal cortex of ZDF rats

MAPK activation has been related to enhanced oxidative stress in the renal cortex during diabetes and contributes to the promotion of the disease.^{7,18} Thus, phosphorylated and total levels of ERK, JNK and p38 were evaluated in the three groups of animals by western blot.

Fig. 3A and B illustrate that phosphorylated levels of ERK were similar in ZL and ZDF-Co rats, whereas ZDF-C animals showed enhanced values of p-ERK when compared to other groups. In addition, phosphorylated levels of JNK and p38 were not modified in any group of rats (Fig. 3A, C and D). Likewise there was no difference in the total levels of ERK, JNK and p38 among groups. Therefore, the cocoa-rich diet totally prevented the activation of ERK, which could contribute to

attenuation of the redox imbalance in the renal cortex of ZDF-Co animals.

3.5. Cocoa-rich diet regulates AMPK, mTOR and SIRT-1 in the renal cortex of ZDF rats

AMPK, SIRT-1 and mTOR have important cytoprotective roles in renal cells against different types of stress, and also during diabetes.^{3,24} Then, the modulation of these proteins by the cocoa-rich diet was studied, and total and phosphorylated levels of AMPK and mTOR, as well as total levels of SIRT-1, were assayed by western blot or immunohistochemistry.

Phosphorylated levels of AMPK were diminished in ZDF-C animals in comparison with ZL and ZDF-Co groups (Fig. 4A and B). Accordingly, levels of total and phosphorylated mTOR increased in ZDF-C rats when compared to ZL and ZDF-Co animals (Fig. 4A, C and D). Cocoa-rich diet totally restored to ZL values the altered levels of p-AMPK and mTOR; however, the ZDF-Co group showed a partial recovery of p-mTOR values,

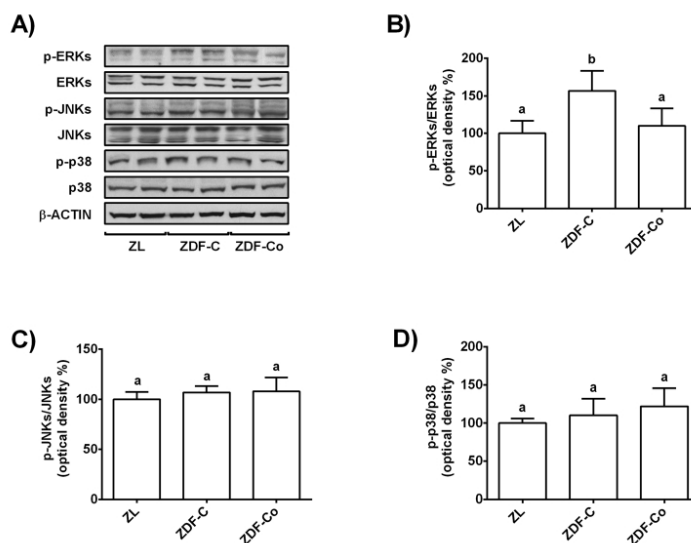


Fig. 3 Effect of the cocoa-rich diet on phosphorylated and total levels of ERK, p-38, JNK in the renal cortex of ZDF rats. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of (B) p-ERK/ERK, (C) p-JNK/JNK and (D) p-p38/p38 ratios relative to ZL animals (means \pm SD, $n = 6-8$). Equal loading of western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$).

as these animals displayed levels intermediate to those of lean and diabetic rats. Indeed, the highest levels of p-mTOR were found in the tubulointerstitium area in the ZDF-C group, whereas this protein was clearly diminished in the renal cortex sections of ZL and ZDF-Co rats (Fig. 4D). There was no difference in the total levels of AMPK among groups. Additionally, SIRT-1, which was localized in the mesangial area and in the tubular membrane, showed decreased levels in ZDF-C rats when compared to the ZL group, but this effect was totally repressed in animals receiving the cocoa rich-diet (Fig. 4E). All these results suggest that cocoa might contribute to prevention of the injury in the renal cortex of ZDF rats against the stress insult by modulating key proteins closely related to cellular protection.

3.6. Cocoa-enriched diet activates autophagy in the renal cortex of ZDF rats

AMPK, mTOR and SIRT-1 also play a crucial role in the autophagy process, which is considered a general cellular response to stress that can directly induce cell death or act as a cytoprotective mechanism.^{9,10} Indeed, induction of autophagy has been suggested as a therapeutic target in diabetes kidney disease.⁹ Then, key autophagy proteins, such as p62, Beclin-1 and LC3, were studied by western blot.

As shown in Fig. 5A and B, p62 levels increased in the renal cortex of ZDF-C rats when compared to ZL animals, but this effect was completely reverted in animals receiving the cocoa

rich-diet. In contrast, values of Beclin-1 and LC3-II/LC3-I ratio decreased in ZDF-C animals in comparison with the lean group, whereas rats fed with the cocoa-rich diet showed higher levels than those of the ZL group (Fig. 5A, C and D). All these results suggest that the cocoa-rich diet might also contribute to protection of the kidney through the induction of autophagy in ZDF rats.

3.7. Cocoa-rich diet modulates proliferation and apoptosis in the renal cortex of ZDF rats

During diabetes the situation of stress in renal tubular cells may lead to alterations in growth and apoptosis.^{2,10,25} In fact oxidative stress and autophagy can contribute to the regulation of apoptosis during diabetes in the kidney.¹⁰ Therefore, to get further insight into the mechanisms for the protective effect of cocoa intake in the renal cortex of ZDF rats, cell proliferation and apoptosis were analysed by PCNA and TUNEL assays, respectively, and key proteins related to the apoptotic process were evaluated by western blot.

Cortical renal sections showed an increased level of PCNA positive cells, *i.e.* higher percentage of tubular proliferating cells in ZDF-C rats when compared to the ZL group, showing ZDF-Co animals' intermediate values to those of lean and diabetic rats (Fig. 6A). Similarly, the representative photographs for TUNEL-positive cells showed a pro-apoptotic effect in the renal cortical tubular cells of ZDF-C rats, whereas cocoa intake totally prevented all these changes (Fig. 6B). Besides, PCNA-

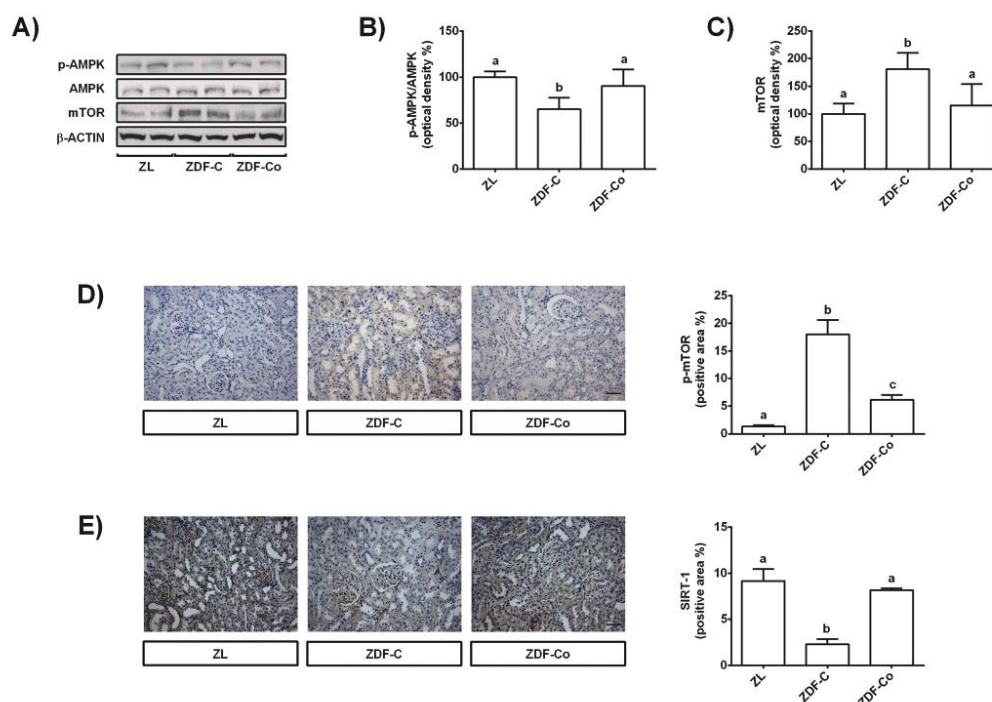


Fig. 4 Effect of the cocoa-rich diet on phosphorylated and total values of AMPK and mTOR, and in total levels of SIRT-1 in the renal cortex of ZDF rats. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of densitometric quantification for (B) p-AMPK/AMPK ratio, and (C) mTOR. Values are expressed as a percentage relative to the control condition (means \pm SD, $n = 6-8$). Representative sections of the renal cortex for immunohistochemical staining of (D) p-mTOR and (E) SIRT-1. p-mTOR and SIRT-1 (both brown-stained) are expressed as the percentage of positive area in the renal cortex. Scale bar: 20 μ m. Data represent means \pm SD of 6–8 samples per condition. Mean values with unlike letters were significantly different ($P < 0.05$).

and TUNEL-positive cells were scarcely observed in the glomeruli, the majority of proliferating and apoptotic cells being localized in the tubules (Fig. 6A and B).

To better characterize the molecular mechanisms involved in these processes, the expressions of anti-apoptotic (Bcl-x_L) and pro-apoptotic (Bax) members of the Bcl-2 protein family, as well as levels of cleaved caspases-9 and -3, were examined. As shown in Fig. 6C–E, ZDF-C rats presented decreased Bcl-x_L expression values along with a concomitant increase in Bax levels. However, feeding animals with the cocoa-enriched diet raised Bcl-x_L levels and reduced Bax values, displaying both proteins with comparable values to those of the ZL group (Fig. 6C–E). Similarly, cleaved caspase-9 and -3 levels were enhanced in the ZDF-C group, and these values were restored to control levels (ZL) when animals received the cocoa-rich diet (Fig. 6C, F and G). These findings indicate that the cocoa-supplemented diet might also contribute to the renal protective effect by improving the cellular homeostasis in the renal cortex

of ZDF rats, as it prevented the enhanced proliferation and apoptosis observed in the diabetic animals (ZDF-C).

4. Discussion

Oxidative stress is a major determinant for the development and progression of the diabetic kidney disease.⁴ Thus, new candidates aimed to decrease or inhibit sources of ROS, to enhance antioxidant defences and to modulate processes related to the stress, such as apoptosis or autophagy, constitute a promising approach for the development of new strategies against the diabetic kidney disease. In this regard, cocoa has demonstrated antioxidant and antidiabetic activities.^{11,12,26} However, insufficient investigation *in vivo*, especially at the molecular level, has been performed to support these observations during the diabetic kidney disease.

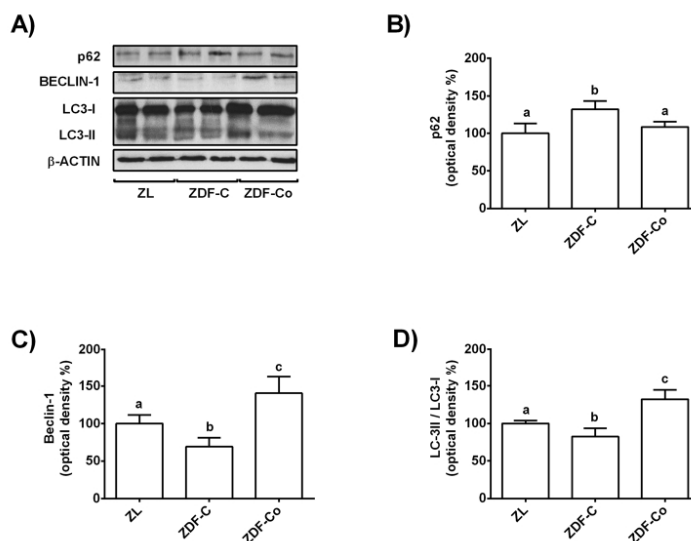


Fig. 5 Effect of the cocoa-rich diet on levels of p62, Beclin-1, and LC3-II/LC3-I ratio in the renal cortex of ZDF rats. (A) Bands of representative experiments. Percentage data of (B) p62, (C) Beclin-1 and (D) LC3-II/LC3-I ratio relative to ZL rats (means \pm SD, $n = 6-8$). Equal loading of western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ significantly ($P < 0.05$).

The present work provides the first *in vivo* evidence that a cocoa-rich diet improves the functionality of kidneys by exerting renoprotective effects as it contributes to the maintenance of the redox balance and cellular homeostasis through the activation of autophagy and inhibition of apoptosis in the renal cortex of ZDF rats. The cocoa-rich diet suppresses the increased ROS generation, protein carbonyl content and NOX-4 levels in ZDF animals. Furthermore, cocoa positively modulates renal antioxidant defences (p-Nrf2 levels, and SOD and CAT activities), as well as levels of proteins closely related to oxidative stress (ERK-MAPKs) and to cytoprotection (AMPK, mTOR and SIRT-1). Likewise, cocoa contributes to alleviation of the renal injury through the regulation of the autophagy and apoptosis processes in the renal cortex of ZDF rats.

Diabetes is characterized by chronic hyperglycaemia along with hyperinsulinaemia at the early stage of the disease.^{12,19,21} However, both parameters were partly alleviated to control values (ZL group) in those animals fed with the cocoa-rich diet. In this line, it has been reported that cocoa improves the glucose metabolism in different diabetic rodent models, as it amended the glucose homeostasis and insulin sensitivity.^{17,19,26,27} Indeed, although in the present work the glucose metabolism in the liver at the beginning of the study has not been examined, which could be considered as a limitation of the work, the effect of cocoa on this organ could not be ruled out, as well as its contribution to the glucose metabolism.¹⁴ In addition, in ZDF rats (ZDF-C and ZDF-Co) food intake increased in comparison with non-diabetic ZL animals,

demonstrating the hyperphagic and obese state of ZDF animals.^{14,17,21} Nevertheless, the body weight was lower in ZDF-Co rats when compared to ZDF-C animals, although total food intake was similar in both groups; this feature has been associated with the ability of cocoa polyphenols to reduce fat adipose tissue.^{14,16,27}

Clinically, the early stage of the diabetic kidney disease is characterized by renal hyperfunction and hypertrophy.² Indeed, the hyperfunctionality is accompanied by hyperfiltration, which explains the high levels of uric acid and creatinine, as well as the increased values of ACR as a consequence of the albuminuria in ZDF-C rats (Table 2). All these changes were highly reverted by feeding ZDF rats with cocoa. Similarly, foods rich in flavanols (cocoa-enriched in flavanols and green tea) or pure flavanols alone, such as epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and procyanidin B2, have demonstrated protective effects against diabetes-induced functional alterations of kidneys in different diabetic rodent models.^{18,28,29}

Hyperfiltration caused by the diabetic milieu activates a number of pathological pathways, such as oxidative stress-related routes, among others.^{2,7,10} In this line, levels of ROS and the marker of protein oxidation (carbonyl groups) increased in ZDF-C rats, whereas these effects were prevented by the cocoa-rich diet. Accordingly, in ZDF-C rats increased levels of NOX-4, which is considered the main source of ROS during this disease, were highly recovered to ZL values by feeding the animals with cocoa. The exacerbated oxidative stress observed in ZDF-C rats led to a depleted antioxidant



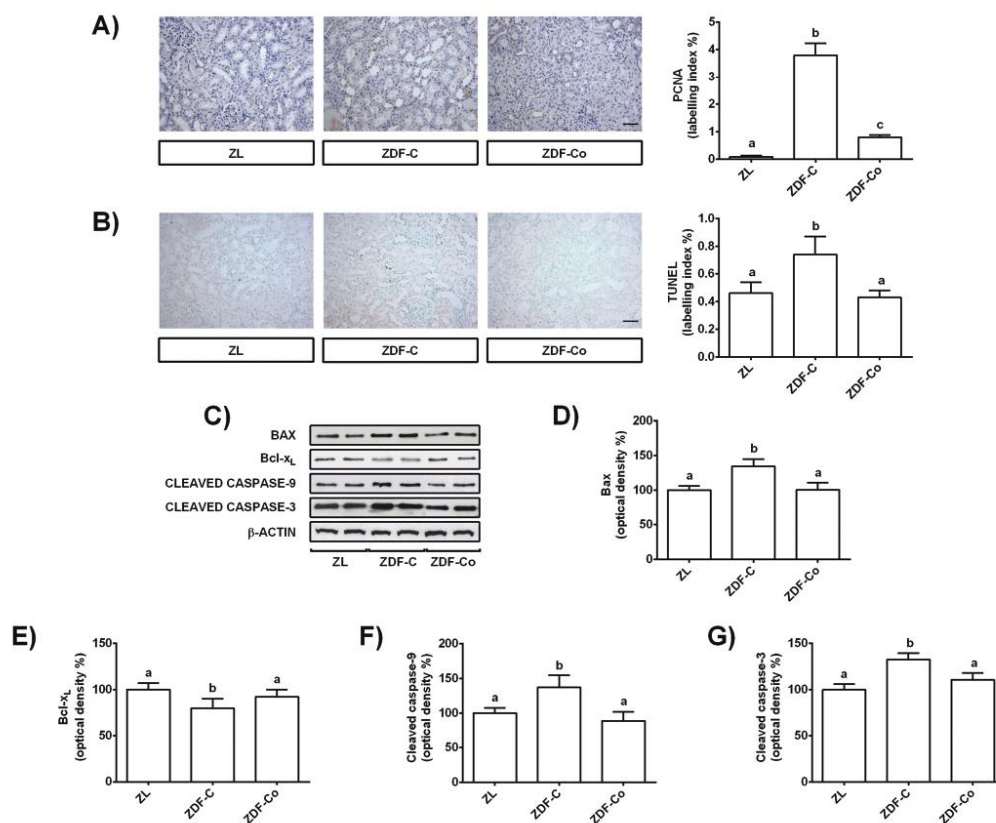


Fig. 6 Effect of the cocoa-rich diet on PCNA, apoptotic index (TUNEL) and total levels of Bax, Bcl-x_L, cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 in the renal cortex of ZDF rats. (A) Representative photographs for immunohistochemical staining of PCNA-positive cells (scale bar = 20 μm) and proliferative index expressed as the percentage of labelling index in the renal cortex. (B) Representative sections for immunohistochemical staining of TUNEL positive cells (scale bar = 20 μm) and apoptotic index expressed as the percentage of labelling index in the renal cortex. (C) Representative bands of western blot analyses. Percentage levels of (D) Bax, (E) Bcl-x_L, and cleaved (F) caspase-9 and (G) caspase-3 relative to ZL animals (means ± SD, n = 6–8). Equal loading of western blots was ensured by β-actin. Means without a common letter differ significantly (*P* < 0.05).

defence system (reduced SOD and CAT activities, and decreased nuclear p-Nrf2 levels), although the antioxidant response was restored in animals fed with cocoa. In agreement with our results, diminished activities of SOD and CAT and unaltered levels of GSH and GPx and GR activities in the kidney of diabetic rats have been reported.^{30–32} In addition, a cocoa-diet enriched in flavanols, a procyanidin extract, epicatechin, EGCG, and procyanidin B2 have shown to suppress the oxidative stress by attenuating ROS generation, protein carbonyl content, and NOX-4 levels, and by increasing the activity of CAT and SOD antioxidant enzymes in different diabetic models.^{28,31–36} In this regard, epicatechin restored the redox status in cultured renal tubular cells subjected to a high-glucose-challenge, playing NOX-4 a relevant role in this protec-

tive effect;²³ indeed, inhibition of NOX-4 occurred along with increased SOD activity, reduced oxidative stress markers and improved renal functionality,^{23,37} in concordance with the present results. Moreover, active Nrf2 modulates antioxidant enzymes and has demonstrated a protective effect against the diabetic kidney disease.^{7,38} In agreement with this work, the natural compounds betulinic acid and sulfurophane, as well as the flavonoid resveratrol, prevented the diabetic kidney disease by upregulating Nrf2 and downstream genes (SOD and CAT, among others).^{32,38,39} However, the regulation of the redox status is complex and different pathways are involved in ROS generation (NOX, dysfunctional mitochondrial chain, xanthine oxidase, nitrosative stress, etc.), which leads to the activation of different routes, such as nuclear factor-κB,

MAPKs, etc.⁴⁰ Therefore, the involvement of different signals related to oxidative stress on the cocoa-induced protective effect cannot be ruled out.

Excessive oxidative stress results in the activation of different pathways, including MAPKs.⁷ In concert, high levels of phosphorylated-ERK-MAPK have been demonstrated during the diabetic kidney disease in rats.^{18,36,41} Similarly to the current study, feeding diabetic animals with anthocyanins, procyanidin B2 or EGCG abolished the increased p-ERK values, this inhibition being associated with a reduced oxidative stress and with a renoprotective effect.^{18,36,41}

AMPK, SIRT-1 and m-TOR are proteins regulated by oxidative and metabolic stress.^{3,24} During diabetes kidney disease decreased levels of AMPK and SIRT-1 together with enhanced values of m-TOR have been reported.^{31,32,34,42} Correspondingly, in diabetes (also in ZDF-C animals) reduced AMPK levels have been associated with the activation of NOX-4, as well as with diminished SIRT-1 values concurrently with decreased CAT and SOD activities, and worsened albuminuria and renal function.^{23,34,43} However, the cocoa-rich diet (ZDF-Co rats) highly or completely recovered all mentioned parameters to control values (ZL group). Consistent with these findings, a cocoa diet enriched in flavanols, as well as epicatechin and procyanidins, prevented renal SIRT-1 and AMPK diminution, which was associated with a renoprotective effect and improved cellular redox status in *in vivo* and *in vitro* diabetic models.^{23,31–34,42} Moreover, it has been shown that AMPK and SIRT-1 stimulation protected against ROS-mediated damage by suppressing NOX-4 activation in renal cells.^{23,34} Indeed, SIRT-1 and AMPK activations have also been related to increased levels of Nrf2 and its downstream antioxidant targets in diabetic complications.⁴⁴ Consequently, the activation of the AMPK-SIRT-1 signalling has been connected to an improved redox status and organ functionality in the kidney of diabetic rodents.^{32,44}

Impaired autophagy is associated with decreased AMPK, which leads to the activation of the mTOR pathway, and diminished levels of SIRT-1,⁹ as shown in the present work for ZDF-C diabetic rats. Importantly, autophagy plays a crucial role in the pathogenesis of the diabetic kidney disease, as it is an essential mechanism to maintain the homeostasis of tubules and glomeruli in the renal cortex.⁹ Thus, reduced autophagy and enhanced levels of p62 have been reported in renal cortical cells of diabetic animals and patients.^{25,45} Accordingly, accumulation of p62, and decreased levels of Beclin-1 and LC3-II/LC3-I ratio were observed in ZDF-C rats. However, the inhibition of autophagy was prevented by feeding the animals with cocoa. These results were associated with recovered levels of AMPK and SIRT-1, and diminished values of mTOR when compared to the ZDF-C group. Correspondingly, the flavonoid resveratrol has been reported to activate renal AMPK and SIRT-1 and to reverse the mTOR stimulation, which in turn activated the autophagy and contributed to amelioration of the renal injury in diabetic animals.^{46,47}

Oxidative stress and autophagy dysregulation are also related to apoptosis, and both processes can contribute to

favour this type of programmed cell death in the kidney during diabetes.^{3,10} Accordingly, ZDF-C rats showed a deteriorated antioxidant system, a reduced autophagy flux, and increased levels of active caspases-3 and -9, as well as enhanced values of Bax concurrently with diminished expression of Bcl-x_L, and consequently, augmented the apoptotic index (TUNEL), together with an increased proliferative index (PCNA), as previously shown in renal tubules of diabetic animals.^{28,48} Indeed, the enhanced proliferation in the renal cortex has been associated with the early tubular hypertrophy and hyperplasia, as a consequence of the renal hyperfunctionality.² However, the altered cell turnover (proliferative-apoptotic levels) was highly or completely prevented by feeding the animals with cocoa, which was also associated with an improved redox status and with a renoprotective effect. Similarly, the antidiabetic drug pioglitazone and the triterpenoid betulinic acid showed antiapoptotic and antiproliferative effects in the kidney of diabetic rats, which alleviated the injury in the organ.^{32,48} Quercetin-rich juice, procyanidins, EGCG and anthocyanins also prevented the oxidative stress-induced damage and restored the redox status in diabetic animals and renal cellular models through the inhibition of apoptosis (diminished levels of cleaved caspase-3).^{28,41,42,49} In this line, catalase overexpression in proximal tubules of transgenic diabetic mice has been shown to attenuate tubular apoptosis.⁵⁰ Likewise, it could be highlighted that the restored levels of SIRT-1 and AMPK showed after treatments with procyanidins in *in vivo* and *in vitro* renal diabetic models have not only been related to an inhibition of oxidative stress, as mentioned, but also to a suppression of apoptosis, which led to an ameliorated damage in renal cells.^{31,42} Finally, administration of food rich in flavonoids or natural compounds, such as quercetin-rich juice or resveratrol, also contributed to restore the balanced activity of autophagy and apoptosis in the kidney of diabetic animals and to improve the functionality of the organ;^{46,47,49} therefore, it has been suggested that autophagy induction to an appropriate level could be beneficial for the treatment of this renal disease.⁵¹

Interestingly, the health beneficial effects of cocoa have been mainly related to its flavanols, although a role for the fibre should be considered. In this line, it has been recently reported that most of the beneficial effects attributed to cocoa are not only due to its fibre content, and polyphenols and other compounds could also be key factors.⁵² Thus, epicatechin and procyanidins seem to contribute in the maintenance of renal function and structure during diabetes.^{17,33,35,42} In addition, theobromine alone can protect against uric acid crystallization,⁵³ and in combination with cocoa flavanols enhance their protective vascular effects,⁵⁴ which also seem to participate in the preservation of kidneys. It is also worth mentioning that, using the body surface area normalisation method,⁵⁵ the amount of cocoa employed in the present animal study is equivalent to a daily dose of 64.5 g cocoa, containing 1075 mg polyphenols, for a 60 kg human. Although this total phenolic intake could be considered realistic, the amount of cocoa required is certainly above a recommended individual inges-



tion. Accordingly, a human intervention trial has been conducted using 20 g d⁻¹ of polyphenol-rich dark chocolate containing 1000 mg polyphenols.⁵⁶ This dose of 20 g d⁻¹ of enriched dark chocolate represents 5–10% of dietary energy, an amount that most people could readily incorporate into their diet. However, more research needs to be done using lower doses of cocoa with greater physiological relevance to humans.

5. Conclusions

In summary, the present work shows for the first time that in the renal cortex cocoa exerts protective effects by contributing to the balance of the redox status in ZDF diabetic rats, as it prevented ROS generation, protein oxidation, and activation of stress related key proteins (ERK-MAPKs and NOX-4), as well as the diminution of antioxidant defences (CAT, SOD, Nrf2), and modulates cytoprotective-related proteins, namely AMPK, SIRT-1 and mTOR. In addition, cocoa-rich diet modulates the autophagy (p62, Beclin-1 and LC3-II/LC3-I ratio) and apoptosis (caspase-3, -9, Bax, Bcl-x_L, TUNEL and PCNA) pathways, contributing to the balance between both processes and to amelioration of the renal injury in the renal cortex of ZDF rats. This study provides *in vivo* evidence about the beneficial effects derived from the cocoa intake on the protection of the cortical renal function during diabetes, providing the underlying mechanisms related to crucial processes involved in the development of diabetic nephropathy (redox status, autophagy and apoptosis), as well as potential therapeutic targets for the prevention and therapy of this disease.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This work was supported by the grant AGL2015-67087-R (MINECO/FEDER, UE) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MINECO). D. Álvarez-Cilleros is a FPI fellow from the predoctoral program of MINECO (BES-2016-076721). We acknowledge support of the publication fee by the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URICI).

References

- 1 P. H. Winocour, Diabetes and chronic kidney disease: an increasingly common multi-morbid disease in need of a paradigm shift in care, *Diabetic Med.*, 2018, **35**, 300–305.
- 2 J. M. Forbes and M. E. Cooper, Mechanisms of diabetic complications, *Physiol. Rev.*, 2013, **93**, 137–188.
- 3 V. Vallon, The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney, *Am. J. Physiol.: Regul., Integr. Comp. Physiol.*, 2011, **300**, R1009–R1022.
- 4 R. C. Stanton, Oxidative stress and diabetic kidney disease, *Curr. Diabetes Rep.*, 2011, **11**, 330–336.
- 5 F. N. Ahmed, F. N. Naqvi and F. Shafiq, Lipid peroxidation and serum antioxidant enzymes in patients with type 2 diabetes mellitus, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2006, **1084**, 481–489.
- 6 V. Ramakrishna and R. Jailkhani, Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) patients, *Acta Diabetol.*, 2010, **45**, 41–46.
- 7 L. Rochette, M. Zeller, Y. Cottin and C. Vergely, Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies, *Biochim. Biophys. Acta*, 2014, **1840**, 2709–2729.
- 8 M. Sedeek, A. C. Montezano, R. L. Hebert, S. P. Gray, E. Di Marco, J. C. Jha, M. E. Cooper, K. Jandeleit-Dahm, E. L. Schiffrin, J. L. Wilkinson-Berka and R. M. Touyz, Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes-potential targets for novel therapies, *J. Cardiovasc. Trans. Res.*, 2012, **5**, 590–518.
- 9 Y. Ding and M. E. Choi, Autophagy in diabetic nephropathy, *J. Endocrinol.*, 2015, **224**, R15–R30.
- 10 K. Turkmen, Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse, *Int. Urol. Nephrol.*, 2017, **49**, 837–844.
- 11 J. Giacometti, D. Muhvic, A. Pavletic and D. Dudaric, Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, antiinflammatory, anticarcinogenic, and antineurotic activity in carbon tetrachloride intoxicated mice, *J. Funct. Foods*, 2016, **23**, 177–187.
- 12 M. A. Martín, L. Goya and S. Ramos, Antidiabetic actions of cocoa flavanols, *Mol. Nutr. Food Res.*, 2016, **60**, 1756–1769.
- 13 J. A. Vinson, J. Proch, P. Bose, S. Muchler, P. Taffera, D. Shutta, N. Samman and G. A. C. Agbor, Chocolate is a powerful *ex vivo* and *in vitro* antioxidant, antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 8071–8076.
- 14 I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, F. Escrivá, C. Álvarez, L. Goya and S. Ramos, Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats, *J. Nutr. Biochem.*, 2015, **26**, 704–712.
- 15 D. Grassi, G. Desideri, S. Necozione, C. Lippi, R. Casale, G. Properzi, J. B. Blumberg and C. Ferri, Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate, *J. Nutr.*, 2008, **138**, 1671–1676.
- 16 M. Fidaleo, A. Fracassi, A. Zuurro, R. Lavecchia, S. Moreno and C. Sartori, Cocoa protective effects against abnormal fat storage and oxidative stress induced by a high-fat diet involve PPAR α signalling activation, *Food Funct.*, 2014, **5**, 2931–2939.
- 17 D. Álvarez-Cilleros, E. López-Oliva, L. Goya, M. A. Martín and S. Ramos, Cocoa intake attenuates renal injury in





- Zucker Diabetic fatty rats by improving glucose homeostasis, *Food Chem. Toxicol.*, 2019, **127**, 101–109.
- 18 Z. Zhang, B.-Y. Li, X.-L. Li, M. Cheng, F. Yu, W.-D. Lu, Q. Cai, J.-F. Wang, R.-H. Zhou, H.-Q. Gao and L. Shen, Proteomic analysis of kidney and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice indicate MFG-E8 as a key molecule in the development of diabetic nephropathy, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, **1832**, 805–813.
 - 19 I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, L. Goya and S. Ramos, Cocoa intake ameliorates hepatic oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats, *Food Res. Int.*, 2015, **69**, 194–201.
 - 20 E. Ramiro-Puig, M. Urpi-Sarda, F. J. Pérez-Cano, A. Franch, C. Castellote, C. Andres-Lacueva, M. Izquierdo-Pulido and M. Castell, Cocoa-enriched diet enhances antioxidant enzyme activity and modulates lymphocyte composition in thymus from young rats, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 6431–6438.
 - 21 B. L. Leonard, R. N. Watson, K. M. Loomes, A. R. J. Phillips and G. J. Cooper, Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: a metabolic characterisation of obese and lean phenotypes, *Acta Diabetol.*, 2005, **42**, 162–170.
 - 22 J. Hempe, R. Elvert, H.-L. Schmitts, W. Kramer and A. W. Herling, Appropriateness of the Zucker Diabetic Fatty rat as a model for diabetic microvascular late complications, *Lab. Anim.*, 2012, **46**, 32–39.
 - 23 D. Alvarez-Cilleros, M. A. Martín, L. Goya and S. Ramos, (–)-Epicatechin and the colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid protect renal proximal tubular cell against high glucose-induced oxidative stress by modulating NOX-4/SIRT-1 signalling, *J. Funct. Foods*, 2018, **46**, 19–28.
 - 24 C.-M. Hao and V. H. Haase, Sirtuins and their relevance to the kidney, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2010, **21**, 1620–1627.
 - 25 M. Kitada, Y. Ogura, I. Monno and D. Koya, Regulating autophagy as therapeutic target for diabetic nephropathy, *Curr. Diab. Res.*, 2017, **17**, DOI: 10.1007/s11892-017-0879-y.
 - 26 A.-M.-M. Jalil, A. Ismail, C.-P. Pei, M. Hamid and S.-H.-S. Kamaruddin, Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (ob-db) rats, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 7877–7884.
 - 27 A. Ruzaidi, I. Amin, A. G. Nawalyah, M. Hamid and H. A. Faizul, The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats, *J. Ethnopharmacol.*, 2005, **98**, 55–60.
 - 28 T. Mohan, P. Velusamy, L. N. Chakrapani, A. K. Srinivasan, A. Singh, T. Johnson and K. Periandavan, Impact of EGCG supplementation on the progression of diabetic nephropathy in rats: an insight into fibrosis and apoptosis, *J. Agric. Food Chem.*, 2017, **65**, 8028–8036.
 - 29 W. M. Renno, S. Abdeen, M. Alkhalaf and S. Asfar, Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats, *Br. J. Nutr.*, 2008, **100**, 652–659.
 - 30 S. Mohamad, A. Taha, R. N. K. Bamezai, S. F. Basir and N. Z. Baquer, Lower doses of vanadate in combination with trigonella restore altered carbohydrate metabolism and antioxidant status in alloxan-diabetic rats, *Clin. Chim. Acta*, 2004, **342**, 105–114.
 - 31 L. Bao, X. Cai, X. Dai, Y. Ding, Y. Jiang, Y. Li, Z. Zhang and Y. Li, Grape seed proanthocyanidin extracts ameliorate podocyte injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α in low-dose streptozotocin- and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats, *Food Funct.*, 2014, **5**, 1872–1880.
 - 32 R. Xie, H. Zhang, X.-Z. Wang, X.-Z. Yang, S.-N. Wu, H.-G. Wang, P. Shen and T.-H. Ma, The protective effect of betulinic acid (BA) diabetic nephropathy on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats, *Food Funct.*, 2017, **8**, 299–306.
 - 33 L. Bao, X. Cai, Z. Zhang and Y. Li, Grape seed procyanidin B2 ameliorates mitochondrial dysfunction and inhibits apoptosis via the AMP-activated protein kinase–silent mating type information regulation 2 homologue 1–PPAR γ co-activator-1 α axis in rat mesangial cells under high-dose glucosamine, *Br. J. Nutr.*, 2015, **113**, 35–44.
 - 34 A. Papadimitriou, E. B. M. I. Peixoto, K. C. Silva, J. M. Lopes de Faria and J. B. Lopes de Faria, Increase in AMPK brought about by cocoa is renoprotective in experimental diabetes mellitus by reducing NOX4/TGF β -1 signalling, *J. Nutr. Biochem.*, 2014, **25**, 773–784.
 - 35 P. D. Prince, C. Rodríguez-Lanzi, C. G. Fraga and M. Galleano, Dietary (–)-epicatechin affects NF- κ B activation and NADPH oxidases in the kidney cortex of high-fructose-fed rats, *Food Funct.*, 2019, **10**, 26–32.
 - 36 X. H. Yang, Y. Pan, X. L. Zhan, B. L. Zhang, L. L. Guo and H. M. Jin, Epigallocatechin-3-gallate attenuates renal damage by suppressing oxidative stress in diabetic db/db mice, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2016, **2016**, 2968462.
 - 37 B. Y. Jeong, H. Y. Lee, C. G. Park, J. Kang, S. L. Yu, D. R. Choi, S. Y. Han, M. H. Park, S. Cho, S. Y. Lee, W. M. Hwang, S. R. Yun, H. M. Ryu, E. J. Oh, S. H. Park, Y. L. Kim and S. H. Yoon, Oxidative stress caused by activation of NADPH oxidase 4 promotes contrast-induced acute kidney injury, *PLoS One*, 2018, **13**, e0191034.
 - 38 W. Cui, Y. Bai, X. Miao, P. Luo, Q. Chen, Y. Tan, M. J. Rane, L. Miao and L. Cai, Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation, *Oxid. Med. Cell. Longevity*, 2012, 821936, DOI: 10.1155/2012/821936.
 - 39 P. Palsamy and S. Subramanian, Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2–Keap1 signaling, *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, **1812**, 719–731.
 - 40 A. Duni, V. Liakopoulos, S. Roumeliotis, D. Peschos and E. Dounousi, Oxidative stress in the pathogenesis and evolution of chronic kidney disease: untangling Ariadne's thread, *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, **20**, 3711, DOI: 10.3390/ijms20153711.
 - 41 J. Wei, H. Wu, H. Zhang, F. Li, S. Chen, B. Hou, Y. Shi, L. Zhao and H. Duan, Anthocyanins inhibit high glucose-induced renal tubular cell apoptosis caused by oxidative stress in db/db mice, *Int. J. Mol. Med.*, 2018, **41**, 1608–1618.



- 42 X. Cai, L. Bao, J. Ren, Y. Li and Z. Zhang, Grape seed procyanidin B2 protects podocytes from high glucose-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via the AMPK-SIRT1-PGC-1 α axis in vitro, *Food Funct.*, 2016, **7**, 805–815.
- 43 S. Hou, F. Zheng, Y. Li, L. Gao and J. Zhang, The protective effect of glycyrrhizic acid on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 15026–15043.
- 44 S. L. Habib, A. Yadav, D. Kidane, R. H. Weiss and S. Liang, Novel protective mechanism of reducing renal cell damage in diabetes: Activation AMPK by AICAR increased NRF2/OGG1 proteins and reduced oxidative DNA damage, *Cell Cycle*, 2016, **15**, 3048–3059.
- 45 K. Yamahara, S. Kume, D. Koya, Y. Tanaka, Y. Morita, M. Chin-Kanasaki, H. Araki, K. Isshiki, S.-I. Araki, M. Haneda, T. Matsusaka, A. Kashiwagi, H. Maegawa and T. Uzu, Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2013, **24**, 1769–1781.
- 46 L. Ma, R. Fu, Z. Duan, J. Lu, J. Gao, L. Tian, Z. Lv, Z. Chen, J. Han, L. Jia and L. Wang, Sirt1 is essential for resveratrol enhancement of hypoxia-induced autophagy in the type 2 diabetic nephropathy rat, *Pathol. Res. Pract.*, 2016, **212**, 310–318.
- 47 X.-H. Xu, D.-F. Ding, H.-J. Yong, C.-L. Dong, N. You, X.-L. Ye, M.-L. Pan, J.-H. Ma, Q. You and Y.-B. Lu, Resveratrol transcriptionally regulates miRNA-18a-5p expression ameliorating diabetic nephropathy via increasing autophagy, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2017, **21**, 4952–4965.
- 48 J. E. Toblli, G. Cao, J. F. Giani, M. Angerosa, F. P. Dominici and N. F. Gonzalez-Cadavid, Antifibrotic effects of pioglitazone at low doses on the diabetic rat kidney are associated with the improvement of markers of cell turnover, tubular and endothelial integrity, and angiogenesis, *Kidney Blood Pressure Res.*, 2011, **34**, 20–33.
- 49 C. F. Lin, Y. T. Kuo, T. Y. Chen and C. T. Chien, Quercetin-rich guava (*Psidium guajava*) juice in combination with trehalose reduces autophagy, apoptosis and pyroptosis formation in the kidney and pancreas of type II diabetic rats, *Molecules*, 2016, **21**, 334, DOI: 10.3390/molecules21030334.
- 50 M. L. Brezniceanu, F. Liu, C. C. Wei, I. Chénier, N. Godin, S. L. Zhang, J. G. Filep, J. R. Ingelfinger and J. S. Chan, Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells, *Diabetes*, 2008, **57**, 451–459.
- 51 W.-H. Wu, M.-P. Zhang, F. Zhang, F. Liu, Z.-X. Hu, Q.-D. Hu, X.-Y. Yan and S.-M. Hunag, The role of programmed cell death in streptozotocin-induced early diabetic nephropathy, *J. Endocrinol. Invest.*, 2011, **34**, e296–e301.
- 52 M. Massot-Cladera, A. Franch, M. Castell and F. J. Pérez-Cano, Cocoa polyphenols and fiber modify colonic gene expression in rats, *Eur. J. Nutr.*, 2017, **56**, 1871–1885.
- 53 A. Costa-Bauza, F. Grases, P. Calvo, A. Rodriguez and R. M. Prieto, Effect of consumption of cocoa-derived products on uric acid crystallization in urine of healthy volunteers, *Nutrients*, 2018, 1516, DOI: 10.3390/nu10101516.
- 54 R. Sansone, J. I. Ottaviani, A. Rodriguez-Mateos, Y. Heinen, D. Noske, J. P. Spencer, A. Crozier, M. W. Merx, M. Kelm, H. Schroeter and C. Heiss, Methylxanthines enhance the effects of cocoa flavanols on cardiovascular function: randomized, double-masked controlled studies, *Am. J. Clin. Nutr.*, 2017, **105**, 352–360.
- 55 S. Reagan-Shaw, M. Nihal and N. Ahmad, Dose translation from animal to human studies revisited, *FASEB J.*, 2008, **22**, 659–661.
- 56 S. Almoosawi, L. Fyfe, C. Ho and E. Al-Dujaili, The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects, *Br. J. Nutr.*, 2010, **103**, 842–850.

2. Capítulo segundo - Efecto de los flavanoles del cacao sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo vascular en modelos de experimentación.

2.1. Resumen de los estudios en células endoteliales en cultivo.

2.1.1. Artículo VI.



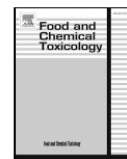
El estrés oxidativo desempeña un papel fundamental en la disfunción endotelial, factor clave en el desarrollo de las patologías vasculares. Diversos estudios ponen de manifiesto que los flavanoles, la mayor fuente de antioxidantes del cacao, podrían estar relacionados con la protección vascular y, en consecuencia, con una disminución del riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la biodisponibilidad de estos compuestos es muy baja por lo que su bioactividad *in vivo* parece estar mediada en parte por los metabolitos colónicos en los que son transformados por la microbiota intestinal. En consecuencia, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el efecto de algunos de estos ácidos fenólicos colónicos derivados de la ingesta de flavonoides (el DHBA, el DHPAA y el HPPA) y de una mezcla de ellos (MIX) sobre el estado oxidativo y la función endotelial en las células EA.hy926. Para ello, se han determinado parámetros redox como la generación de los ROS, los niveles de grupos carbonilos, las principales defensas antioxidantes (el GSH y la GPx), y los niveles de las proteínas que constituyen importantes rutas de señalización implicadas en su funcionalidad (la PI3K/AKT, la AMPK, las MAPKs y la eNOS). Los resultados del estudio muestran que una mezcla de ácidos fenólicos (el DHBA, el DHPAA y el HPPA) a concentraciones fisiológicas (4 μ M cada uno) es capaz de aumentar la funcionalidad de las células EA.hy926 al incrementar los valores fosforilados de la eNOS y la producción del NO. Además, mediante el uso de inhibidores específicos de la AKT y de la AMPK se ha podido demostrar la participación clave de ambas proteínas en el efecto activador de la eNOS. Igualmente, estos compuestos fenólicos fueron capaces también de prevenir la disfunción endotelial y la muerte celular inducida por una

Resultados – Capítulo segundo

situación de estrés oxidativo al disminuir la generación de los ROS, la activación de las ERKs y de las JNKs y, en consecuencia, el daño oxidativo.

Estos resultados nos han permitido concluir que el tratamiento de las células EA.hy926 con una mezcla de ácidos fenólicos derivados de la transformación microbiana de los flavonoides podría prevenir la disfunción endotelial inducida por el estrés oxidativo.

La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por la puesta a punto del modelo *in vitro*, así como por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: la viabilidad por cristal violeta, la producción de los ROS, el contenido del GSH, la actividad de las enzimas antioxidantes, el contenido de grupos carbonilos, la producción del NO y el WB. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.



Colonic metabolites from flavanols stimulate nitric oxide production in human endothelial cells and protect against oxidative stress-induced toxicity and endothelial dysfunction

David Álvarez-Cilleros^a, Sonia Ramos^a, Luis Goya^a, María Ángeles Martín^{a,b,*}

^a Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

^b Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Cocoa flavanols
Endothelium
Oxidative injury
Signaling pathways
Cardiovascular diseases

ABSTRACT

Oxidative stress is involved in endothelial dysfunction, the key player in the development of vascular events. Flavanols, the major antioxidants in cocoa have been related to vascular protection and lower cardiovascular risk. However, the bioavailability of cocoa flavanols is very low and their bioactivity *in vivo* seems to be greatly mediated by the derived phenolic metabolites formed by intestinal microbiota. Hence, we investigated whether microbial-derived flavanol metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA) and a mix of them could influence endothelial function and prevent oxidative stress in human endothelial cells (Ea.hy926). Our results revealed that a mixture of flavanol colonic metabolites significantly increased phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and nitric oxide (NO) production. By using specific inhibitors, we also established the participation of the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and protein kinase B (AKT) in eNOS activation. Likewise, flavanol metabolite mix protected against oxidative stress-induced endothelial dysfunction and cell death by preventing increased ROS generation and activation of signaling pathways related to oxidative stress. We concluded that flavanol colonic metabolites could exert beneficial effects in endothelial cells and prevent oxidative stress-induced vascular dysfunction.

1. Introduction

Endothelial-derived nitric oxide (NO), produced by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS), plays a central role in maintaining vascular integrity and endothelial function (Moncada et al., 1991). In the presence of cardiovascular risk factors such as hypertension, hypercholesterolemia or diabetes mellitus, the endothelium undergoes functional and structural alterations resulting in decreased NO bioavailability and endothelial dysfunction, the first step of atherosclerosis (Liao, 2013). Although multiple mechanisms are involved in endothelial cell injury, increased oxidative stress seems to be the common underlying mechanism for the development of endothelial dysfunction (Magenta et al., 2013). Consequently, considerable efforts have been made in the last recent years for the identification of natural

antioxidant compounds that may provide valuable strategies to prevent oxidative stress and the development of cardiovascular disease (CVD).

Accordingly, epidemiological and clinical studies have indicated that regular consumption of cocoa or cocoa products rich in flavanols has a beneficial effect in normal endothelium and in consequence reduces the risk of CVD (Lin et al., 2016; Zhang et al., 2013). Furthermore, the results obtained from clinical trials with obese, hypertensive or smokers individuals also support that cocoa flavanols could re-establish endothelial dysfunction in abnormal endothelium (Davison et al., 2008; Grassi et al., 2008; Heiss et al., 2005). For that and other reasons, in 2012 the European Food Safety Authority (EFSA) claimed for the first time that a cause-and-effect relationship may be established between the consumption of cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilation (European Food Safety

Abbreviations: AKT/PKB, protein kinase B; AMPK, adenosine monophosphate-activated protein kinase; DAF-FM-DA, 4-amino-5-methylamino-2,7-difluoro fluorescein diacetate; DCFH-DA, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DHBA, 2,3-dihydroxybenzoic acid; DHPAA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; ERK, extra cellular regulated kinase; GPx, glutathione peroxidase; GSH, glutathione; HPPA, 3-hydroxyphenylpropionic acid; JNKs, Jun N-terminal kinases; NO, endothelial-derived nitric oxide; PI3K, phosphatidylinositol-3-kinase; t-BOOH, tert-butyl hydroperoxide

* Corresponding author. Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, 28040, Madrid, Spain.

E-mail address: amartina@ictan.csic.es (M.Á. Martín).

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.006>

Received 11 January 2018; Received in revised form 28 February 2018; Accepted 8 March 2018

Available online 09 March 2018

0278-6915/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Authority, 2012). EFSA also proposed an increase of NO production by eNOS as the most likely mechanism by which cocoa flavanols could induce an acute effect on endothelium-dependent vasodilation.

Flavanols present in cocoa consist predominantly of monomeric catechins (mainly epicatechin) and oligomeric flavanols (procyanidins) ranging from dimers to decamers. Among these, epicatechin has been proposed as the responsible for the acute effects of cocoa flavanols in endothelial function as they can be found in plasma two hours following consumption of cocoa (Actis-Goretta et al., 2012). Nevertheless, blood concentrations of epicatechin after a single dose of cocoa flavanol, returns to baseline 2–4 h after ingestion (Actis-Goretta et al., 2012); therefore, the relative contribution of epicatechin to the long-term effects of cocoa flavanols on fasting endothelium-dependent vasodilation is imprecise. However, procyanidins and the fraction of epicatechin which is not absorbed in the small intestine reach the colon where they are largely metabolized by the microbiota into various phenolic acids, including phenylpropionic, phenylacetic and benzoic acid derivatives (Del Rio et al., 2013). These small phenolic acids are then absorbed and could appear in plasma 8–12 h after ingestion of cocoa products (Urpi-Sarda et al., 2009). In fact, the C_{max} of these colonic metabolites is reached about 6 h after the flavanol intake and its half-life ($T_{1/2}$) values ranged from 3.1 to 7.6 h (Ottaviani et al., 2016). Hence, these phenolic metabolites produced by colonic microbiota could certainly contribute to the long-term effects of cocoa flavanols on fasting endothelium vasodilatation. More importantly, some of them have been shown to possess potential health beneficial effects (Álvarez-Cilleros et al., 2018; Fernández-Millán et al., 2014; Qiu et al., 2013). However, up to date, whether these cocoa flavanol microbial metabolites exert a direct effect on fasting endothelium-dependent vasodilation remains to be elucidated.

In this context, the aim of the present study was to investigate the *in vitro* effects of the microbial-derived flavanol metabolites 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA) and 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA) and a mixture of them on endothelial function in human endothelial cells (EA.hy926) and the mechanism involved. Furthermore, the protective effect against oxidative stress-induced cell toxicity and endothelial dysfunction was also evaluated.

2. Material and methods

2.1. Materials and chemical

3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DHPAA), 2,3-dihydroxybenzoic acid (DHBA), 3-hydroxyphenylpropionic acid (HPPA), *o*-phthalaldehyde (OPT), gentamicin, penicillin G, streptomycin, bovine serum albumin (fraction V), 6-[4-(2-piperidin-1-ylethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-ylpyrazolo[1,5-a]pyrimidine (Comp C), LY294002 (LY) and *tert*-butyl hydroperoxide (t-BOOH) were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). The fluorescent probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) and 4-amino-5-methylamino-2,7-difluorofluorescein diacetate (DAF-FM-DA) were from Molecular Probes (Eugene, OR). Anti-protein kinase B (AKT), anti-phospho-Ser473-AKT (p-AKT), anti-adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), anti-phospho-Thr172-AMPK (p-AMPK), anti-phospho-Ser1177-endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS), anti-extra cellular regulated kinases (ERKs), anti-phospho-ERKs (p-ERKs), anti-c-Jun N-terminal kinases (JNKs) and anti- β -actin were obtained from Cell Signaling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-eNOS (eNOS), anti-phospho-JNKs (p-JNKs) and anti- α -actinin were purchased from Santa Cruz (sc-376751, sc-6254, sc-17829, respectively, Quimigen, Madrid, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis and the Bradford reagent were from BioRad (BioRad Laboratories S.A., Madrid, Spain). Cell culture dishes were from Falcon (Cajal, Madrid, Spain) and cell culture medium and foetal bovine serum from Lonza (Madrid, Spain).

2.2. Cell culture and treatments

Experiments were performed using the human endothelial cell line EA.hy926 (Edgell et al., 1983) derived from fusing human umbilical vein endothelial cells with the permanent human cell line A549. The cells (a gift from Drs. Patricio Aller and Carmelo Bernabeu, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain) were maintained in a humidified incubator containing 5% CO₂ and 95% air at 37 °C. They were grown in DMEM media, supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% of the following antibiotics: gentamicin, penicillin and streptomycin. The different concentrations of DHPAA, DHBA and HPPA (1–10 μ M) were diluted in DMEM culture medium (4.5 g/L glucose; 0.9 g/L of glutamine) and added to the cell plates for 18 h. The doses of colonic metabolites employed in this work are considered physiologically relevant since concentrations ranging between 0.1 and 10 μ M have been found in biological fluids after regular consumption of cocoa and cocoa derived products (Urpi-Sarda et al., 2009). A mixture of microbial metabolites (MIX) at 4 μ M each one (4 μ M of DHPAA + 4 μ M of DHBA + 4 μ M of HPPA) was also added to the culture medium in order to test the potential additive and synergist effects of the metabolites. In the experiments with the pharmacological inhibitors, cells were pre-incubated with 10 μ M of LY294002 (AKT inhibitor), or 5 μ M of Compound C (AMPK inhibitor) for 1 h prior to DHPAA, DHBA, HPPA and MIX treatment.

To evaluate the protective effect of microbial phenolic metabolites against an oxidative stress, after DHPAA, DHBA, HPPA and the MIX treatment the medium was discarded and fresh medium containing 25–100 μ M of t-BOOH and the different treatments was added for 18 h more.

2.3. Evaluation of cell viability and ROS production

Cell viability was determined by using the crystal violet assay. EA.hy926 cells were seeded at low density (2×10^5 cells per well) in 24-well plates. After the different treatments, cells were incubated with crystal violet (0.2% in ethanol) for 20 min. Plates were rinsed with distilled water, allowed to dry, and 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) added. The absorbance of each well was measured using a microplate reader at 570 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

Cellular ROS were quantified by the DCFH assay (Wang and Joseph, 1999) using a microplate reader. For the assay, cells were plated in 24-well multiwells and incubated with the different treatments. After that, 10 μ M DCFH was added to the wells for 30 min at 37 °C. After being oxidized by intracellular oxidants, DCFH will become dichlorofluorescein (DCF) and emit fluorescence. ROS generation was evaluated in a fluorescent microplate reader at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA).

2.4. Determination of reduced glutathione (GSH) concentration and glutathione peroxidase (GPx) activity

The concentration of GSH was evaluated by a fluorometric assay previously described in Quéguineur et al. (2012). The method takes advantage of the reaction of GSH with OPT at pH 8.0 and fluorescence was measured at an emission wavelength of 460 nm and an excitation wavelength of 340 nm. The determination of GPx activity is based on the oxidation of reduced glutathione by GPx, using t-BOOH as a substrate, coupled to the disappearance of NADPH by glutathione reductase (Quéguineur et al., 2012).

2.5. Determination of nitric oxide production

NO production by endothelial cells was measured using the fluorescence probe DAF-FM which is a fluorinated DAF-2 derivative with improved NO sensitivity. The diacetate form of DAF-FM (DAF-2-DA)

cross the cell membrane where is cleaved by intracellular esterases to form the negatively charged parent compound DAF-2 which cannot cross the cell membrane and thus accumulates inside the cells. In the presence of NO, DAF-2 is transformed in a highly fluorescent triazole (DAF-2T). NO production was detected by spectrofluorometric following the optimized method for the detection of NO in the low-nM range developed for Leiker et al. (Leikert et al., 2001). Briefly, cells were plated in 24-well multiwells (2×10^5 cells per well) and incubated with the different treatments. After that, $0.1 \mu\text{M}$ DAF-2 was added to the wells for 30 min at 37°C . Then, cells were rinsed three times with PBS. The fluorescence of cells and supernatants (PBS) was evaluated in a fluorescence microplate reader at an excitation wavelength of 495 nm and an emission wavelength of 515 nm (Bio-Tek, Winooski, VT, USA). The auto-fluorescence obtained from PBS without cells was subtracted from each value. Intracellular NO was also visualized by fluorescence microscopy. To this end, cells were seeded on 24-well plates and exposed to the desired treatments. Then, cells were loaded with $2.5 \mu\text{M}$ of DAF-2-DA for 30 min at 37°C , rinsed three times with PBS and observed under an inverted fluorescence Leica AF6000 LX microscope (excitation wavelength: 488 nm; emission wavelength: 515 nm).

2.6. Preparation of cell lysates for western blotting

To detect eNOS, p-eNOS, AKT, p-AKT, AMPK, p-AMPK, ERKs, p-ERKs, JNKs and p-JNKs, cells were lysed at 4°C in a buffer containing 25 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM 1,4-Dithiothreitol, 0.1% Triton X-100, 200 mM β -glycerolphosphate, 0.1 mM Na_3VO_4 , $2 \mu\text{g/mL}$ leupeptin, and 1 mM PMSF. Supernatants were collected, assayed for protein concentration by using the Bradford reagents, aliquoted and stored at -80°C until used for Western blot analyses.

2.7. Protein determination by western blotting

Equal amounts of protein ($100 \mu\text{g}$) were separated by SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride filters (Protein Sequencing Membrane, BioRad). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated antirabbit Ig (GE Healthcare, Madrid, Spain). Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare). Normalization of Western blot was ensured by β -actin or α -actinin and bands were quantified using a scanner and accompanying software.

2.8. Determination of carbonyl groups

Protein oxidation of cells was measured as carbonyl groups content according to a published method (Fernández-Gómez et al., 2016). In brief, samples containing $500 \mu\text{g}$ of protein were treated for duplicate. One of the samples received 2,4-dinitrophenylhydrazine (0.2%) in 2 M HCl and the other one the same volume of 2 M HCl (blanks). Protein was precipitated by addition of trichloroacetic acid (TCA, 20%) followed by centrifugation for 5 min at $11,750 \text{ g}$. After that, the pelleted protein was washed 3 times with 1.0 mL ethyl acetate:ethanol (1:1). Pellets were allowed to air dry and resuspended in 6 M guanidine. Absorbance was measured at 360 nm and corrected by the blanks. Carbonyl content was expressed as nmol/mg protein using an extinction coefficient of $22,000 \text{ nmol/L/cm}$. Protein concentration was measured by the Bradford reagent.

2.9. Statistics

Prior to statistical analysis, data were tested for homogeneity of variances by the test of Levene; for multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by a Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not

Table 1

Effect of 18 h treatment with noted concentrations of DHPAA, DHBA, HPPA and the colonic MIX on cell viability, intracellular ROS generation, GSH and GPx activity in human endothelial cells.

		% ROS	% cell viability	% of GSH	% GPx
Control		100 ± 4^a	100 ± 7^a	100 ± 9^a	100 ± 4^a
DHPAA	$1 \mu\text{M}$	100 ± 1^a	101 ± 7^a	103 ± 10^a	100 ± 7^a
	$4 \mu\text{M}$	100 ± 4^a	101 ± 2^a	105 ± 10^a	100 ± 1^a
	$10 \mu\text{M}$	101 ± 5^a	101 ± 3^a	106 ± 16^a	107 ± 7^a
DHBA	$1 \mu\text{M}$	100 ± 2^a	101 ± 6^a	100 ± 17^a	101 ± 2^a
	$4 \mu\text{M}$	100 ± 3^a	101 ± 4^a	100 ± 9^a	101 ± 6^a
	$10 \mu\text{M}$	101 ± 3^a	101 ± 5^a	103 ± 16^a	106 ± 7^a
HPPA	$1 \mu\text{M}$	100 ± 1^a	100 ± 10^a	100 ± 12^a	100 ± 5^a
	$4 \mu\text{M}$	100 ± 3^a	100 ± 10^a	103 ± 13^a	101 ± 6^a
	$10 \mu\text{M}$	101 ± 3^a	100 ± 7^a	105 ± 4^a	110 ± 10^a
MIX	$12 \mu\text{M}$	101 ± 5^a	102 ± 10^a	100 ± 20^a	102 ± 8^a

Data represent means \pm SD of 8–10 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $P < 0.05$.

homogeneous. The level of significance was $P < 0.05$. A SPSS version 23.0 program has been used.

3. Results

3.1. Effects of microbial phenolic metabolites on redox status and viability in endothelial cells

Firstly, in order to discard a potential cell injury by microbial phenolic metabolites, EA.hy926 cells were treated with realistic doses of DHPAA, DHBA and HPPA (1 – $10 \mu\text{M}$) and the MIX ($12 \mu\text{M}$) during 18 h and several parameters related to the cellular redox status and antioxidant response were evaluated. As shown in Table 1, none of the tested concentrations of phenolic metabolites increased ROS generation and crystal violet staining after 18 h, indicating no cellular stress or damage. Similarly, treatment with metabolites evoked no changes in the cellular store of GSH and the activity of GPx. These results ensure that EA.hy926 cells treated with microbial phenolic metabolites (low μM doses) are absolutely functional and in competent conditions to face a stressful challenge.

3.2. Effects of microbial phenolic metabolites in NO production in endothelial cells

Endothelial cells play a crucial role in the maintenance of vascular homeostasis by releasing several vasoactive factors being the most important the endothelium-derived nitric oxide (NO). Therefore, to investigate the role of colonic metabolites in endothelial function we first examined whether physiological concentrations of these metabolites could induce the production of NO in EA.hy926 cells. Hence, the MIX ($12 \mu\text{M}$) and the colonic metabolites individually at 4 and $10 \mu\text{M}$ were added to the cells during 1 or 2 h (short-term) or during 18 h (long-term) and the production of NO was evaluated. As shown in Fig. 1A, treatment of cells with $4 \mu\text{M}$ of each metabolite individually failed to increase the production of NO. However, the mix of these metabolites at the same μM dose ($4 \mu\text{M}$ of DHPAA + $4 \mu\text{M}$ of DHBA + $4 \mu\text{M}$ of HPPA) significantly augmented the generation of NO in endothelial cells at 1 and 2 h while had no significant effect at 18 h. Similarly, concentrations of $10 \mu\text{M}$ of DHPAA, DHBA and HPPA individually were also able to increase the production of NO in EA.hy926 cells at the same short-times. Insulin (100 nM for 15 min) was used as positive control.

According to these results, the MIX ($12 \mu\text{M}$) and the dose of $10 \mu\text{M}$ of DHPAA (the one that individually provokes the greatest increase of NO production) were those selected for subsequent experiments.

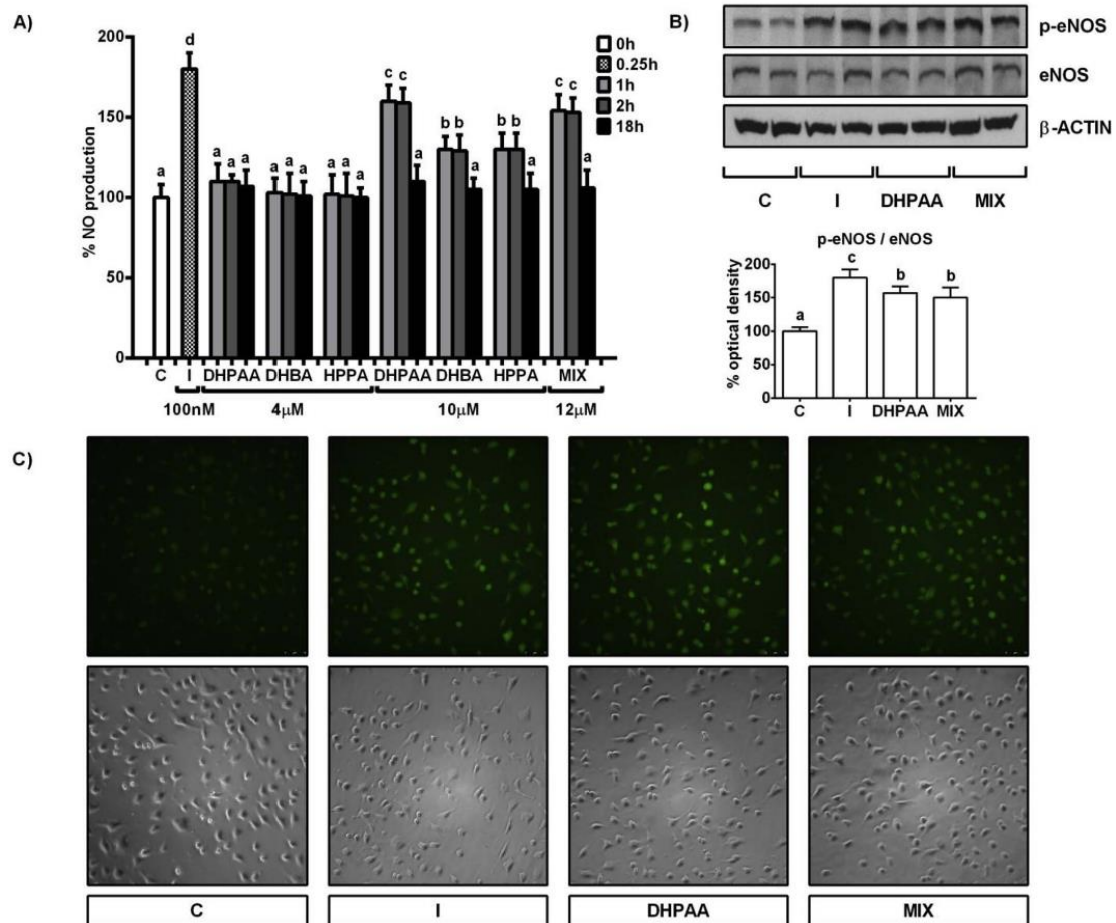


Fig. 1. Effect of colonic flavanol metabolites on NO production in endothelial cells. (A) EA.hy926 cells were treated with insulin (100 nM) for 15 min or with DHPAA (4 and 10 μM), DHBA (4 and 10 μM), HPPA (4 and 10 μM) or the MIX (12 μM) for 1, 2 and 18 h and loaded with DAF2-DA as described under “Materials and Methods”. Fluorescence intensity was monitored at 485 nm excitation and 515 nm emissions using a fluorescence microplate reader. Data represent means \pm SD of 6–8 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $P < 0.05$. (B) EA.hy926 cells treated with insulin (100 nM, 15 min) or DHPAA (10 μM, 2 h) or the MIX (10 μM, 2 h) were subjected to Western blot analysis using specific antibodies to p-eNOS and eNOS. Bands are representative of four to six experiments. Normalization of Western blots was ensured by β -actin. Graphic represents the percentage values of p-eNOS/eNOS relative to the control condition (mean \pm SD). Means without a common letter differ, $P < 0.05$. (C) EA.hy926 cells treated with insulin (100 nM, 15 min) or DHPAA (10 μM, 2 h) or the MIX (12 μM, 2 h) were loaded with DAF2-DA and intracellular NO production was viewed using a fluorescence microscopy as described in “Material and Methods”. Emission of green fluorescence is indicative of NO production. Phase contrast views of cells corresponding to images in the upper panels are also shown. Scale bars: 75 μm.

3.3. DHPAA and the colonic metabolite MIX induce the phosphorylation of eNOS and NO production in human endothelial cells

Since endothelial NO synthase (eNOS) is the key enzyme involved in NO synthesis in endothelial cells, we next investigated the effect of colonic metabolites on eNOS activation. To this end, endothelial cells were cultured for 2 h with 10 μM of DHPAA and 12 μM of the MIX and then immunoblots were performed using phospho- Ser1177 and non-phospho-antibodies against eNOS. As shown in Fig. 1B, the levels of p-eNOS were significantly increased in the presence of DHPAA and the MIX. Moreover, there was no difference in the total levels of eNOS in any treatment, suggesting that metabolites are able to phosphorylate/activate eNOS without increasing its protein expression. According to that, the stimulatory effect of colonic metabolites was accompanied by an increase in intracellular NO production (as shown before) that was additionally confirmed by fluorescence microscopy (Fig. 1C).

3.4. Colonic flavanol metabolites increased endothelial function via AKT and AMPK

Next, to elucidate the mechanisms underlying the increase in eNOS phosphorylation in response to colonic metabolites, AMPK and AKT, upstream transducers of eNOS phosphorylation, were also evaluated. To this end, endothelial cells were treated with 10 μM of DHPAA and 12 μM of the MIX during 2 h and then immunoblots were performed using the phosphorylated and total antibodies against AKT and AMPK. As shown in Fig. 2, both DHPAA and the MIX increased the phosphorylated levels of AKT and AMPK; however, the activation/phosphorylation of AKT induced by DHPAA was larger than that induced by the MIX. Both compounds had no effect on total AMPK and AKT.

To further determine the potential role of these pathways in eNOS activation induced by colonic metabolites, we next investigated the effects of specific inhibitors of AKT and AMPK on eNOS

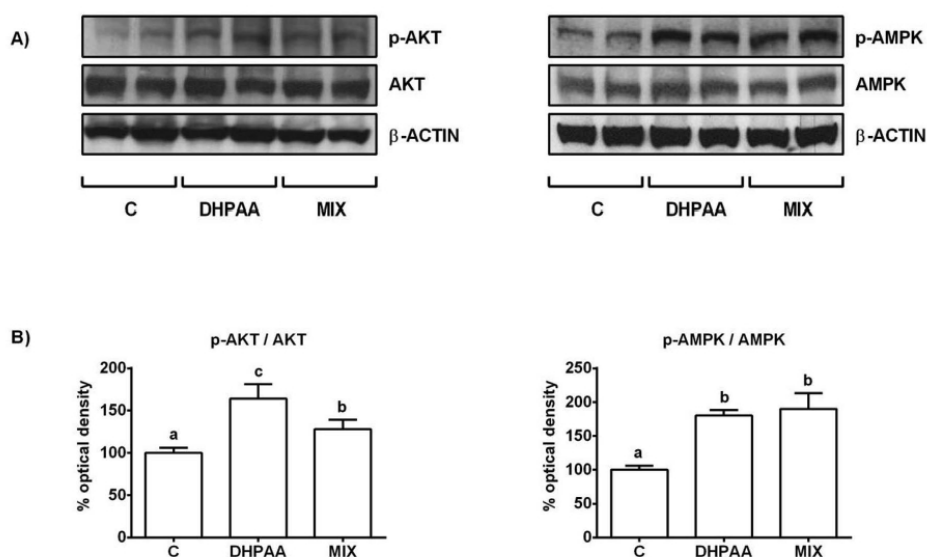


Fig. 2. DHPAA and the colonic MIX induce phosphorylation of AKT and AMPK in human endothelial cells. EA.hy926 cells treated with 10 μ M DHPAA and 12 μ M of the MIX for 2 h were subjected to Western blot analysis using phospho-specific antibodies to AKT and AMPK. The same cell lysates were subjected to Western blot analysis using corresponding non-phospho-specific antibodies to detect total AKT and AMPK. (A) Bands are representative of four to six experiments. (B) Percentage values of p-AKT/AKT and p-AMPK/AMPK relative to the control condition (mean \pm SD). Normalization of Western blots was ensured by β -actin. Means without a common letter differ, $P < 0.05$.

phosphorylation and NO production induced by DHPAA and the MIX. Accordingly, cells were pre-incubated with 10 μ M LY (AKT inhibitor) or 5 μ M of Comp C (AMPK inhibitor) 1 h before and during the 2 h of DHPAA and MIX treatment. As shown in Fig. 3A, DHPAA- and MIX-induced phosphorylation of eNOS was partially blocked with LY and Comp C pre-incubation. Accordingly, the production of NO induced by DHPAA and the MIX was partially blocked with the pharmacological inhibition of AKT and AMPK (Fig. 3B). Altogether, these results suggest that both AKT and AMPK are involved in the upregulation of NO production induced by colonic metabolites in EA.hy926 cells.

3.5. Colonic flavanol metabolites protect endothelial cells against *t*-BOOH induced oxidative stress and cell death

Since oxidative stress has been related to endothelial cell death and dysfunction, in the following experiments we investigated the potential of microbial phenolic metabolites to protect endothelial cells against chemically-induced oxidative stress. To this end, we used a chemical compound commonly used to induce oxidative insults in biological systems (*t*-BOOH). The first goal was to determine the conditions of *t*-BOOH culture leading to increased oxidative stress and cell death in EA.hy926 cells. To this purpose, cells were treated for 18 h with different concentrations of *t*-BOOH, and ROS generation and cell viability were determined. Fig. 4A reveals that increasing concentrations of the pro-oxidant induced a dose-dependent increase in the production of ROS and in cell death. Since the dose of 100 μ M *t*-BOOH caused 50–60% increase in ROS generation and cell death, that was the concentration chosen for the following experiments.

Then, endothelial cells were treated with 10 μ M DHPAA and 12 μ M of the MIX during 18 h and further submitted to 100 μ M *t*-BOOH for 18 h more. As shown in Fig. 4, treatment of cells with *t*-BOOH enhanced ROS generation (Fig. 4B) and protein cell damage (measured as carbonyl groups) (Fig. 4C) resulting in a remarkable decrease of endothelial cell viability (Fig. 4D). Nevertheless, 18 h of pre-treatment with DHPAA or the MIX significantly prevented the condition of oxidative stress induced by *t*-BOOH including cell viability.

3.6. Colonic flavanol metabolites protect endothelial cells against *t*-BOOH induced endothelial dysfunction

A reduction in endothelial-derived NO production is considered the major mechanism of endothelial dysfunction; therefore, we next investigated the effect of oxidative stress in eNOS activation. As expected, *t*-BOOH treatment for 18 h significantly decreased the activation/phosphorylation of eNOS whereas the pre-incubation with 10 μ M DHPAA and 12 μ M of MIX partially restored the eNOS phosphorylation (Fig. 5A). To further explore the potential signaling pathway contributing to the protective effect of DHPAA and the MIX, we examined the phosphorylation of ERK and JNK kinases. As shown in Fig. 5B, *t*-BOOH remarkably activated the phosphorylation of both kinases at 4 h; on the contrary, DHPAA and the MIX pre-treatment effectively mitigated the effects of *t*-BOOH on ERK and JNK phosphorylation.

Altogether, these results clearly indicate that the chemically-induced oxidative stress and endothelial dysfunction in EA.hy926 cells were significantly recovered with realistic concentrations of DHPAA and the MIX.

4. Discussion

More than 80% of flavanols ingested in the diet are metabolized by colonic microbiota generating several phenolic metabolites, which may contribute in a great extend to their reported biological activities (Monagas et al., 2010). In fact, these derived colonic metabolites are currently considered as the most plausible candidates responsible for the health properties derived from flavanol consumption. According to this, studies aimed to investigate the potential beneficial effects of circulating metabolites at physiological concentrations and the characterization of their mechanisms of action are at present receiving much interest. In the present study, we demonstrated for the first time that phenolic acids derived from flavanol microbial metabolism can induce *in vitro* NO production in human endothelial cells. Likewise, we showed that this effect was largely mediated via AMPK and PI3K/AKT pathways and the subsequent eNOS phosphorylation/activation. More

Resultados – Capítulo segundo

D. Álvarez-Cilleros et al.

Food and Chemical Toxicology 115 (2018) 88–97

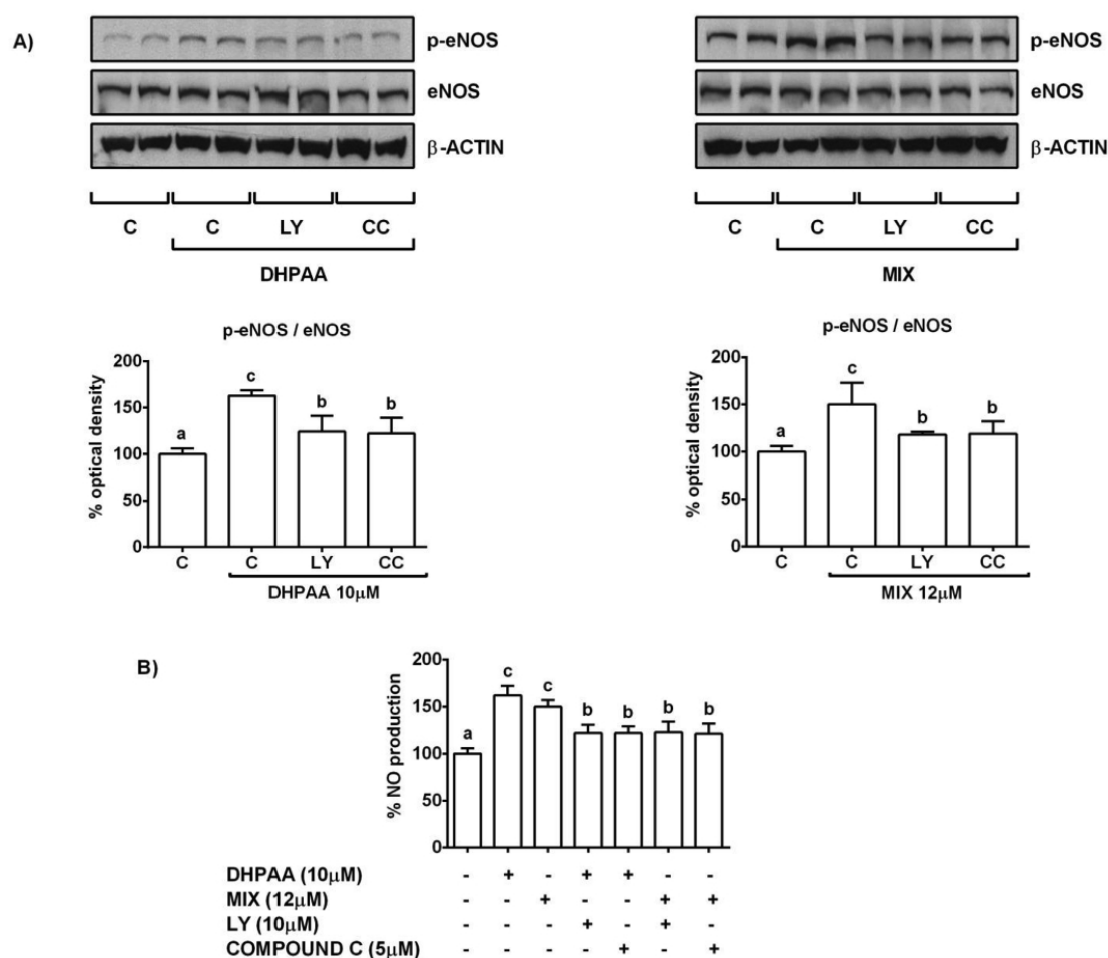


Fig. 3. DHPAA and the MIX increased endothelial function via AKT and AMPK. EA.hy926 cells were pre-incubated with 10 μM LY (selective inhibitor of AKT), and 5 μM of Comp C (selective inhibitor of AMPK) for 1 h prior to DHPAA (10 μM) and MIX (12 μM) treatment for 2 h. (A) Control and treated-cells were subjected to Western blot analysis using antibodies to p-eNOS and eNOS. Bands are representative of four to six experiments. Normalization of Western blots was ensured by β-actin. Graphic represents the percentage values of p-eNOS/eNOS relative to the control condition (mean ± SD). (B) Control and treated-cells were loaded with DAF2-DA and NO levels were detected as described under “Materials and Methods”. Fluorescence intensity was monitored at 485 nm excitation and 515 nm emissions using a fluorescence microplate reader. Data represent means ± SD of 6–8 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $P < 0.05$.

importantly, under conditions of oxidative stress, derived flavanol colonic metabolites were also able to protect against endothelial dysfunction and cell death by reducing ROS generation and ERK and JNK activation.

After regular consumption of flavanols-rich foods (mainly cocoa and cocoa derived products) mono- and di-hydroxylated phenylpropionic, phenylacetic and hydroxybenzoic acids and their conjugated form (sulphates and glucuronidates) are the most abundant metabolites in both urine and fasting plasma (Urpi-Sarda et al., 2009). However, it has been proved that conjugation could be a reversible process *in vivo*; therefore, the observed effects *in vivo* may be due to the deconjugated forms (Menendez et al., 2011; Perez-Vizcaino et al., 2012). Consequently, in this work, we investigated the potential beneficial effect of some of these phenolic acids (3,4-DHPAA, 2,3-DHBA and 3-HPPA) on endothelial function. The use of these flavanol-derived colonic metabolites *in vitro* reflects physiological conditions more accurately than the use of pure dietary compounds such as monomeric catechins and procyanidins

(Monagas et al., 2010). Besides, we used realistic doses (1–10 μM) since phenolic acids and its conjugated forms could be detected in plasma at low μM concentrations after the intake of foodstuff containing flavanols (Rodríguez-Mateos et al., 2016; Urpi-Sarda et al., 2009).

Interestingly, we found that individual metabolites only were able to induce the production of NO in human aortic endothelial cells at the highest concentration tested (10 μM). However, a mix of the lowest dose of microbial-derived flavanol metabolites (4 μM of DHPAA + 4 μM of DHBA + 4 μM of HPPA) was equally effective to increase NO production in endothelial cells. These results are in agreement with a recent *in vitro* study showing that a mixture of ellagitannin-derived metabolites increased NO bioavailability to a greater extent than the single metabolites alone (Spigoni et al., 2016). More significantly, our data strongly support the hypothesis that beneficial effects of flavanol-rich diets will be mainly due to cumulative or additive activities of several circulating metabolites working together in a synergistic way (Di Gesso et al., 2015).

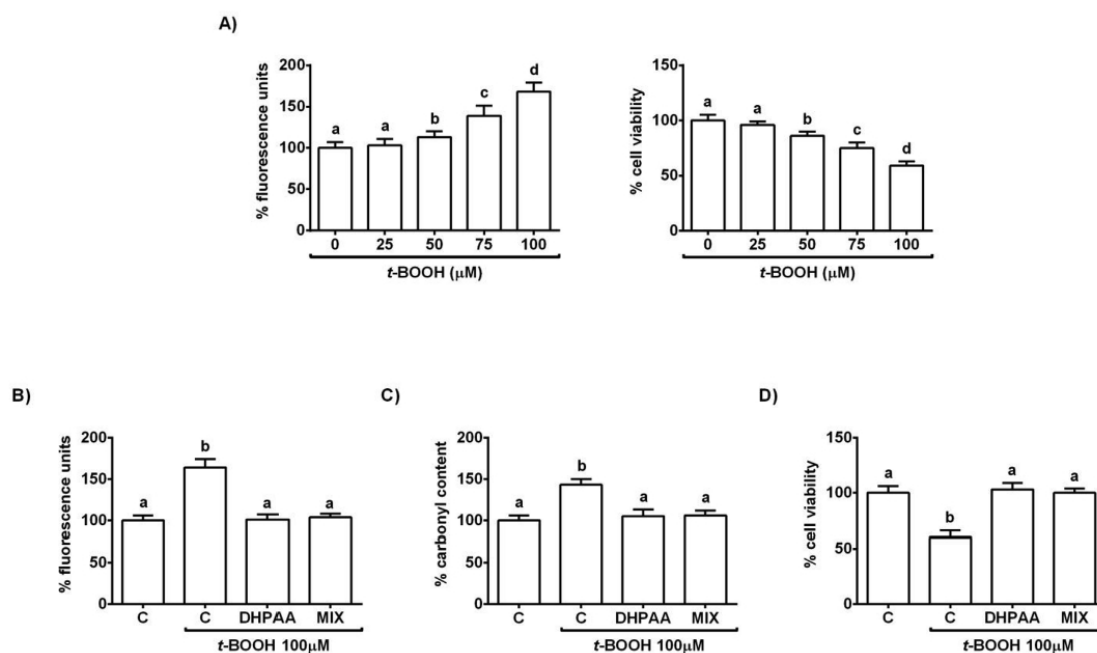


Fig. 4. DHPAA and the colonic metabolite MIX protect human endothelial cells against oxidative stress and cell death. EA.hy926 cells were treated with 25–100 μM of t-BOOH and ROS generation and cell viability was determined at 18 h (A). EA.hy927 cells treated with 10 μM DHPAA and 12 μM of the MIX for 18 h were further exposed to 100 μM t-BOOH for 18 h more and intracellular ROS generation (B), carbonyl group levels (C) and cell viability (D) were measured. Data represent the mean ± S.D. of 10–12 samples per condition. Different letters denote statistically significant differences, $P < 0.05$.

Cocoa and its flavanols have been described to improve endothelial function, reducing thus the risk of cardiovascular morbidity and mortality (Grassi et al., 2015). This positive effect has been largely attributed to epicatechin, a major flavanol in cocoa, which has been demonstrated to induce endothelium-dependent relaxation both in animals and humans (Schmitt and Dirsch, 2009). Particularly, epicatechin phosphorylates and activates eNOS via the PI3K/AKT/PKA and Ca^{2+} -CaM/CaMKII (Ca-calmodulin-dependent protein kinase II) pathways leading to enhanced NO production in human coronary artery endothelial cells (Ramirez-Sanchez et al., 2010). Likewise, under Ca^{2+} -free conditions, epicatechin can also induce eNOS phosphorylation through the formation of an active complex between eNOS, AKT, and heat shock protein 90 (HSP90) (Ramirez-Sanchez et al., 2012). However, studies currently examining the effect on endothelial function of flavanol-derived colonic metabolites, which are the main circulating metabolites in plasma 6–12 h after flavanol intake, are scarce. Accordingly, in this study we showed that a mixture of microbial phenolic acids derived from flavanols significantly enhanced eNOS phosphorylation at Ser1177 increasing thus NO production in cultured endothelial cells. Our results are consistent with those from Najmanová et al. (2016) demonstrating that several flavonoid metabolites formed by colon microbiota caused vasodilation of isolated rat aortic rings; more importantly, we provided a potential mechanism of action of the observations reported by them. Of interest, these outcomes extend the recent progress achieved regarding the beneficial effect of colonic phenolic compounds modulating endothelial function. In particular, small phenolic acids derivatives from anthocyanins were able to induce heme oxygenase-1 (HO-1) and modulate eNOS activity, resulting in reduced superoxide production and improved NO bioavailability in human umbilical vein endothelial cells (Edwards et al., 2015). More recently, Lee et al. (2017) have demonstrated that a major microbial metabolite of proanthocyanidin (5-dihydroxyphenyl-valerolactone)

attenuated THP-1 monocyte-endothelial adhesion in human umbilical vein endothelial cells. Taken together, these findings clearly confirmed that 1) microbial phenolic metabolites may independently have bioactivity improving vascular function and 2) this effect may be definitely crucial since they are probably the main active compounds *in vivo*.

In an effort to identify specific signaling pathways involved in flavanol colonic metabolites-induced effects, we examined the participation of PI3-kinase/AKT and AMPK, which have been described as importantly implicated in the physiological modulation of eNOS phosphorylation (Zheng et al., 2011). AKT, the major downstream target of PI3K, is known to phosphorylate/activate eNOS at Ser1177, playing a crucial role in regulating endothelial NO production (Kang et al., 2013). Likewise, previous studies have shown that AMPK also induces phosphorylation of eNOS at serine-1177 and activates NO generation in endothelial cells (Morrow et al., 2003). According to that, we found that the mixture of flavanol colonic metabolites were able to increase AKT and AMPK phosphorylation in endothelial cells. Besides, the presence of specific inhibitors of these pathways significantly attenuated eNOS phosphorylation and NO production in response to colonic metabolites, suggesting that the effect of flavanol metabolites in eNOS activity is partly mediated by the PI3-kinase/AKT and AMPK signaling pathways. Similar mechanisms of eNOS phosphorylation have also been observed in response to several polyphenolic compounds, including genistein (Liu et al., 2004), epigallocatechin-3-gallate (Lorenz et al., 2004), hesperidin (Rizza et al., 2011), epicatechin (Ramirez-Sanchez et al., 2012), quercetin (Shen et al., 2012) or resveratrol (Liu et al., 2016) and in a number of phytomedicinal preparations (Schmitt and Dirsch, 2009). The identification of colonic metabolites of dietary polyphenols that can influence endothelial NO production and the characterization of their mechanism of action further support the cardioprotective effects of these natural compounds.

Resultados – Capítulo segundo

D. Álvarez-Cilleros et al.

Food and Chemical Toxicology 115 (2018) 88–97

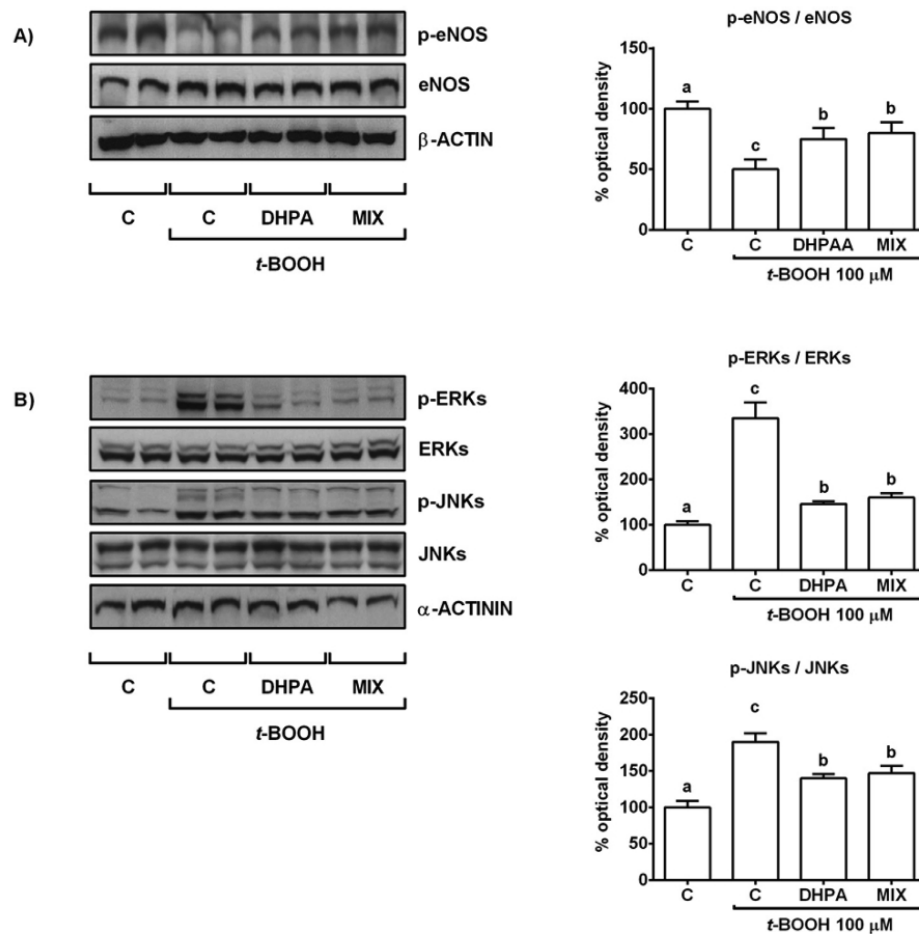


Fig. 5. DHPAA and the colonic metabolite MIX protect human endothelial cells against endothelial dysfunction induced by oxidative stress. EA.hy926 cells were treated with 10 μM DHPAA and 12 μM of the MIX for 18 h. (A) Control and treated-cells were exposed to 100 μM *t*-BOOH for 18 h and subjected to Western blot analysis using antibodies to p-eNOS and eNOS. Bands are representative of four to six experiments. Graphic represents the percentage values of p-eNOS/eNOS relative to the control condition (mean ± SD). Normalization of Western blots was ensured by β-actin. (B) Control and treated-cells were exposed to 100 μM *t*-BOOH for 4 h and subjected to Western blot analysis using antibodies to p-ERKs, ERKs, p-JNKs and JNKs. Bands are representative of four to six experiments. Graphic represents the percentage values of p-ERKs/ERKs and pJNKs/JNKs relative to the control condition (mean ± SD). Normalization of Western blots was ensured by α-actinin. Different letters denote statistically significant differences, $P < 0.05$.

It is interesting to note that natural antioxidant compounds not only may positively influence endothelial NO production but also alleviate the status of oxidative stress, promoting then endothelial function (Luangaram et al., 2007). According to that, it has been recently demonstrated that some phenolic metabolites produced by colonic microbiota could possess anti-oxidant effects (Fernández-Millán et al., 2014; Mele et al., 2017; Qiu et al., 2013). Therefore, we also investigated the potential protective effect of these flavanol colonic metabolites against an oxidative stress induced by *t*-BOOH, a pro-oxidant that has been commonly used to study ROS-induced alterations in various cell types (Martín et al., 2010, 2014; Rodríguez-Ramiro et al., 2012). As expected, we found that *t*-BOOH treatment increased ROS generation and cell oxidative damage, resulting in reduced cell viability in endothelial cells. Likewise, *t*-BOOH treatment provoked the activation of signaling pathways related to oxidative stress such as ERK and JNK kinases and the subsequent decrease in eNOS phosphorylation. However, all these effects were attenuated in cultured cells pre-treated

with colonic metabolites, suggesting that flavanol colonic metabolites can also prevent ROS generation and the activation of specific free radical-generating pathways to avoid oxidative stress and endothelial dysfunction. Similar results have recently been described by Qian et al. (2017) showing that the flavanol colonic metabolite 3-HPA prevented the increase in ROS production evoked by high glucose conditions preserving thus insulin stimulated eNOS phosphorylation and NO production. Nevertheless, we cannot rule out that the ability of these colonic metabolites to activate eNOS via AKT/AMPK pathways could also contribute to protect endothelial cells against oxidant-induced endothelial dysfunction by increasing NO bioavailability. Therefore, the protective effects of these compounds could depend both on their modulation on the oxidative status and their direct activation of AKT/AMPK/eNOS pathway. In any case, these results provide strong evidence that colonic metabolites from flavanols may clearly avoid endothelial dysfunction related to oxidative stress, indicating that their vascular benefits might also result from their antioxidant properties.

In conclusion, in this study we show for the first time that flavanol metabolites formed by colonic microbiota are able to induce NO release via eNOS phosphorylation in human endothelial cells and that this effect seems to be mainly mediated by PI3K/AKT and AMPK pathways. Furthermore, flavanol colonic metabolites can also prevent the increase in ROS generation and the activation of stress-related pathways induced by oxidative insults avoiding thus cell death and endothelial dysfunction. Taken together, these results provide new evidence that the beneficial effects of cocoa flavanols on endothelial function could result, at least in part, from the bioactivity of their colonic metabolites. Interestingly, there are several colonic metabolites in biologic fluids after flavanol intake and we still do not know the full spectrum of these compounds and even less their biological effects.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the grant AGL2015-67087-R (MINECO/FEDER, UE). D. Álvarez-Cilleros is a fellow of the FPI predoctoral program (MINECO, BES-2016-076721).

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.006>.

References

- Actis-Goretta, L., Leveques, A., Giuffrida, F., Romanov- Michailidis, F., Viton, F., Barron, D., Duenas-Paton, M., Gonzalez-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Williamson, G., Dionisi, F., 2012. Elucidation of (–)-epicatechin metabolites after ingestion of chocolate by healthy humans. *Free Radical Biol. Med.* 53, 787–795.
- Álvarez-Cilleros, D., Martín, M.A., Ramos, S., 2018. Epicatechin and the colonic 2,3-dihydroxybenzoic acid metabolite regulate glucose uptake, glucose production, and improve insulin signalling in renal NRK-52E cells. *Mol. Nutr. Food Res.* <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201700470>.
- Davison, K., Coates, A.M., Buckley, J.D., Howe, P.R.C., 2008. Effect of cocoa flavanols and exercise on cardiometabolic risk factors in overweight and obese subjects. *Int. J. Obes. (Lond)* 32, 1289–1296.
- Del Río, D., Rodríguez-Mateos, A., Spencer, J.P.E., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (Poly)phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants Redox Signal.* 18, 1818–1892.
- Di Gesso, J.L., Kerr, J.S., Zhang, Q., Raheem, S., Yalamanchili, S.K., O'Hagan, D., Kay, C.D., O'Connell, M.A., 2015. Flavonoid metabolites reduce tumor necrosis factor- α secretion to a greater extent than their precursor compounds in human THP-1 monocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 59, 1143–1154.
- Edgell, C.J., McDonald, C.C., Graham, J.B., 1983. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 3734–3737.
- Edwards, M., Czank, C., Woodward, G.M., Cassidy, A., Kay, C.D., 2015. Phenolic metabolites of anthocyanins modulate mechanisms of endothelial function. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2423–2431.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2012. Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endothelium-dependent vasodilatation pursuant to Article 13(5) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* 10, 2809–2830.
- Fernández-Millán, E., Ramos, S., Alvarez, C., Bravo, L., Goya, L., Martín, M.A., 2014. Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against *tert*-butylhydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food Chem. Toxicol.* 66, 245–253.
- Fernández-Gómez, B., Ramos, S., Goya, L., Mesa, M.D., del Castillo, M.D., Martín, M.A., 2016. Coffee silverskin extract improves glucose-stimulated insulin secretion and protects against streptozotocin-induced damage in pancreatic INS-1E beta cells. *Food Res. Int.* 89, 1015–1022.
- Grassi, D., Desideri, G., Necozione, S., Lippi, C., Casale, R., Properzi, G., Blumberg, J.B., Ferri, C., 2008. Blood pressure is reduced and insulin sensitivity increased in glucose-intolerant, hypertensive subjects after 15 days of consuming high-polyphenol dark chocolate. *J. Nutr. Biochem.* 138, 1671–1676.
- Grassi, D., Desideri, G., Mai, F., Martella, L., De Feo, M., Soddu, D., Fellini, E., Veneri, M., Stamerra, C.A., Ferri, C., 2015. Cocoa, glucose tolerance, and insulin signaling: cardiometabolic protection. *J. Agric. Food Chem.* 63, 9919–9926.
- Heiss, C., Kleinbongard, P., Dejam, A., Péré, S., Schroeter, H., Sies, H., Kelm, M., 2005.

- Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers. *J. Am. Coll. Cardiol.* 46, 1276–1283.
- Kang, Z., Jiang, W., Luan, H., Zhao, F., Zhang, S., 2013. Cornin induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signaling pathway. *Food Chem. Toxicol.* 58, 340–346.
- Lee, C.C., Kim, J.H., Kim, J.S., Oh, Y.S., Han, S.M., Park, J.H.Y., Lee, K.W., Lee, C.Y., 2017. 5-(30,40-Dihydroxyphenyl)-valerolactone, a major microbial metabolite of proanthocyanidin, attenuates THP-1 monocyte-endothelial adhesion. *Int. J. Mol. Sci.* 18 pii: E1363.
- Leikert, J.F., Rathel, T.R., Muller, C., Vollmar, A.M., Dirsch, V.M., 2001. Reliable in vitro measurement of nitric oxide released from endothelial cells using low concentrations of the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein. *FEBS Lett.* 506, 131–134.
- Liao, J.K., 2013. Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *J. Clin. Invest.* 123, 540–541.
- Lin, X., Zhang, I., Li, A., Manson, J.E., Sesso, H.D., Wang, L., Liu, S., 2016. Cocoa flavanol intake and biomarkers for cardiometabolic health: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Nutr.* 146, 2325–2333.
- Liu, Z., Jiang, C., Zhang, J., Liu, B., Du, Q., 2016. Resveratrol inhibits inflammation and ameliorates insulin resistant endothelial dysfunction via regulation of AMP-activated protein kinase and sirtuin 1 activities. *J. Diabetes* 8, 324–335.
- Liu, D., Homan, L.L., Dillon, J.S., 2004. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology* 145, 5532–5539.
- Lorenz, M., Wessler, S., Follmann, E., Michaelis, W., Dusterhoft, T., Baumann, G., Stangl, K., Stangl, V., 2004. A constituent of green tea, epigallocatechin-3-gallate, activates endothelial nitric oxide synthase by a phosphatidylinositol-3-OHkinase, cAMP-dependent protein kinase, and Akt-dependent pathway and leads to endothelial-dependent vasorelaxation. *J. Biol. Chem.* 279, 6190–6195.
- Luangaram, S., Kukongviriyapan, U., Pakdeechote, P., Kukongviriyapan, V., Pannangpetch, P., 2007. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol.* 45, 448–455.
- Magenta, A., Greco, S., Gaetano, C., Martelli, F., 2013. Oxidative stress and microRNAs in vascular diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 17319–17346.
- Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A., 1991. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109–142.
- Martín, M.A., Fernández-Millán, E., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L., 2014. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 447–456.
- Martín, M.A., Granado-Serrano, A.B., Ramos, S., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., Goya, L., 2010. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzymes activity via ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *J. Nutr. Biochem.* 21, 115–124.
- Mele, L., Carobbio, S., Brindani, N., Curti, C., Rodríguez-Cuenca, S., Bidault, G., Mena, P., Zanotti, I., Vacca, M., Vidal-Puig, A., Del Río, D., 2017. Phenyl- γ -valerolactones, flavan-3-ol colonic metabolites, protect brown adipocytes from oxidative stress without affecting their differentiation or function. *Mol. Nutr. Food Res.* 61, 9. <http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201700074>.
- Menendez, C., Duenas, M., Galindo, P., Gonzalez-Manzano, S., Jimenez, R., Moreno, L., Zarzuelo, M.J., Rodriguez-Gomez, I., Duarte, J., Santos-Buelga, C., Perez-Vizcaino, F., 2011. Vascular deconjugation of quercetin glucuronide: the flavonoid paradox revealed? *Mol. Nutr. Food Res.* 55, 1780–1790.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Andres-Lacueva, C., Bartolomé, B., 2010. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food Funct.* 1, 233–253.
- Morrow, V.A., Foulfelle, F., Connell, J.M., Petrie, J.R., Gould, G.W., Salt, I.P., 2003. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 278, 31629–31639.
- Najmanová, I., Pourová, J., Vopršalová, M., Pilarová, V., Semecký, V., Nováková, L., Mladenka, P., 2016. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl) propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 981–991.
- Ottaviani, J.J., Borges, G., Momma, T.Y., Spencer, J.P.E., Keen, C.L., Crozier, A., Schroeter, H., 2016. The metabolome of [2-¹⁴C](–)-epicatechin in humans: implications for the assessment of efficacy, safety, and mechanisms of action of polyphenolic bioactives. *Sci. Rep.* 6, 29034.
- Perez-Vizcaino, F., Duarte, J., Santos-Buelga, C., 2012. The flavonoid paradox: conjugation and deconjugation as key steps for the biological activity of flavonoids. *J. Sci. Food Agric.* 92, 1822–1825.
- Qian, Y., Babu, P.V.A., Symons, J.D., Jalili, T., 2017. Metabolites of flavonoid compounds preserve indices of endothelial cell nitric oxide bioavailability under glucotoxic conditions. *Nutr. Diabetes* 7 <http://dx.doi.org/10.1038/nutd.2017.34>. e286.
- Qiu, Z., Zhou, B., Jin, L., Yu, H., Liu, L., Liu, Y., Qin, C., Xie, S., Zhu, F., 2013. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food Chem. Toxicol.* 59, 428–437.
- Quéguineur, B., Goya, L., Ramos, S., Martín, M.A., Mateos, R., Bravo, L., 2012. Phloroglucinol: antioxidant properties and effects on cellular oxidative markers in human HepG2 cell line. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2886–2893.
- Ramirez-Sanchez, I., Aguilar, H., Ceballos, G., Villarreal, F., 2012. (–)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: roles of HSP90 and AKT. *Mol. Cell. Biochem.* 370, 141–150.
- Ramirez-Sanchez, I., Maya, L., Ceballos, G., Villarreal, F., 2010. (–)-Epicatechin activation of endothelial cell eNOS, NO and related signaling pathways. *Hypertension* 55, 1398–1405.
- Rizza, S., Muniyappa, R., Iantorno, M., Kim, J., Chen, H., Pullikotil, P., Senese, N.,

Resultados – Capítulo segundo

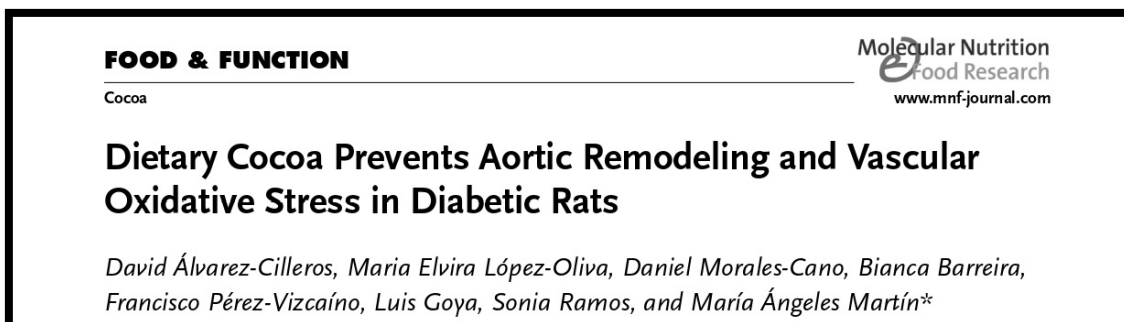
D. Álvarez-Cilleros et al.

Food and Chemical Toxicology 115 (2018) 88–97

- Tesauro, M., Lauro, D., Cardillo, C., Quon, M.J., 2011. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, E782–E792.
- Rodríguez-Mateos, A., Feliciano, R.P., Boeres, A., Weber, T., Dos Santos, C.N., Ventura, M.R., Heiss, C., 2016. Cranberry (poly)phenol metabolites correlate with improvements in vascular function: a double-blind, randomized, controlled, dose-response, crossover study. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 2130–2140.
- Rodríguez-Ramiro, I., Ramos, S., Bravo, L., Goya, L., Martín, M.A., 2012. Procyanidin B2 induces glutathione S-transferase expression and Nrf2 translocation via ERKs and p38-MAPK pathways to protect against oxidative stress in human colonic cells. *Eur. J. Nutr.* 51, 881–892.
- Schmitt, C.A., Dirsch, V.M., 2009. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide* 21, 77–91.
- Shen, Y., Croft, K.D., Hodgson, J.M., Kyle, R., Lee, I.L., Wang, Y., Stocker, R., Ward, N.C., 2012. Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. *Biochem. Pharmacol.* 84, 1036–1044.
- Spigoni, V., Mena, P., Cito, M., Fantuzzi, F., Bonadonna, R.C., Brighenti, F., Dei Cas, A., Del Rio, D., 2016. Effects on nitric oxide production of urolithins, gut-derived ellagitannin metabolites. *Human Aortic Endothelial Cells. Molecules* 21 pii: E1009.
- Urpi-Sarda, M., Monagas, M., Khan, N., Llorach, R., Lamuela-Raventós, R.M., Jauregui, O., Estruch, R., Izquierdo-Pulido, M., Andres-Lacueva, C., 2009. Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 1216, 7258–7267.
- Wang, H., Joseph, J.A., 1999. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic. Biol. Med.* 27, 612–616.
- Zhang, Z., Xu, G., Liu, X., 2013. Chocolate intake reduces risk of cardiovascular disease: evidence from 10 observational studies. *Int. J. Cardiol.* 168, 5448–5450.
- Zheng, Q., Yuan, Y., Yi, W., Lau, W.B., Wang, Y., Wang, X., Sun, Y., Lopez, B.L., Christopher, T.A., Peterson, J.M., Wong, G.W., Yu, S., Yi, D., Ma, X.L., 2011. C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 2616–2623.

2.2. Resumen de los estudios en aorta de animales de experimentación.

2.2.1. Artículo VII.



La T2D se acompaña con daños funcionales y estructurales de la pared arterial que conducen al desarrollo de las complicaciones macrovasculares y a la enfermedad cardiovascular, una de las principales causas de muerte en estos pacientes. Cada vez más se empieza a descubrir que los flavanoles pueden tener un efecto favorable sobre las arterias al mejorar la función vascular y prevenir la rigidez arterial. Dada la gran cantidad de flavanoles presentes en el cacao, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el potencial efecto protector de una dieta rica en cacao sobre las alteraciones estructurales y funcionales vasculares en la diabetes y su mecanismo de acción. Para ello, se ha empleado un modelo animal de T2D, las ratas ZDF. Las ratas macho ZL (no diabéticas) fueron alimentadas con una dieta control y las ratas macho ZDF fueron alimentadas con una dieta control (ZDF-C) o con una dieta enriquecida en cacao al 10% (ZDF-Co) desde la semana diez a la veinte de vida. Al final del estudio, se evaluaron parámetros hemodinámicos, fisiológicos y morfológicos. En homogenados de arteria, se determinaron los niveles de los ROS, de los grupos carbonilos y de las principales defensas antioxidantes (el GSH, la GPx y la GR) así como algunas proteínas relacionadas con los procesos de estrés oxidativo (las MAPKs, el Nrf2, la SIRT-1 y la NOXs). Los resultados de estos estudios han puesto de manifiesto que las ratas diabéticas alimentadas con cacao presentan una disminución de la presión arterial y del *pulso de presión* (PP de sus siglas en inglés Pulse Pressure) y, en consecuencia, de la rigidez aórtica. Igualmente, la dieta rica en cacao evitó el aumento del grosor de la pared arterial y del número de fibras de colágeno y preservó el número y la integridad de las fibras de elastina en los animales diabéticos. Por último, la dieta rica en cacao fue capaz de proteger del incremento del estrés oxidativo aórtico en las ratas diabéticas mediante la disminución de los valores de las proteínas relacionadas con el estrés oxidativo (las ERKs, las JNKs, la NOX-2 y la NOX-4), de los niveles de los ROS y de los grupos carbonilos, así como mediante el aumento de los valores totales y fosforilados de la SIRT-1 y del Nrf2.

Resultados – Capítulo segundo

En conjunto, estos resultados han permitido concluir que la alimentación con una dieta rica en cacao atenúa la rigidez y el remodelado aórtico, así como el estrés oxidativo de los animales con T2D. Este efecto parece estar mediado a través de la modulación de los niveles de las NOXs, de la SIRT-1 y del Nrf2.

La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por el apoyo en el cuidado y mantenimiento del modelo animal *in vivo*, así como por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: la producción de los ROS, el contenido del GSH, la actividad de las enzimas antioxidantes, el contenido de grupos carbonilos, el WB, el GTT y la cuantificación de parámetros fisiológicos con kits comerciales. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.

Dietary Cocoa Prevents Aortic Remodeling and Vascular Oxidative Stress in Diabetic Rats

David Álvarez-Cilleros, Maria Elvira López-Oliva, Daniel Morales-Cano, Bianca Barreira, Francisco Pérez-Vizcaíno, Luis Goya, Sonia Ramos, and María Ángeles Martín*

Scope: The aim of the present study is to investigate the potential protective effect of a cocoa-rich diet on functional and structural vascular alterations in diabetes and the mechanism involved.

Methods and results: Male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats are fed on a standard (ZDF-C) or cocoa-rich diet (ZDF-Co) from week 10 to 20 of life. Diabetic ZDF-C rats showed increased blood pressure and enhanced aortic stiffness, as demonstrated by the increased pulse pressure and the augmented aortic medial thickness with loss and disruption of elastic fibres. Interestingly, cocoa intake strongly avoided all these adverse effects and reduced aortic oxidative stress. Mechanistically, cocoa diet prevented sirtuin-1 (SIRT-1) depletion and increased NADPH oxidases (NOXs) and reactive oxygen species production as well as reduced active nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2) and their antioxidant products.

Conclusion: The results demonstrate for the first time that a cocoa-rich diet strongly prevents aortic stiffening and remodeling in diabetic animals and avoids aortic oxidative stress. It is suggested that this effect could be mediated via its effects on SIRT-1, NOXs, and Nrf2.

Oxidative stress is one of the main pathogenic mechanisms contributing to arterial stiffening and vascular remodeling. In diabetes, overproduction of radical oxygen species (ROS) in the vascular system is mainly attributable to NADPH oxidases (NOXs) activation and/or to a decrease in cellular antioxidant defence mechanisms and close related key proteins.^[3] In particular, levels of sirtuin1 (SIRT-1), a NAD-dependent histone deacetylase, are decreased in diabetic patients and this reduction has been implicated in vasculopathy.^[4] Actually, SIRT-1 protects against ROS-mediated oxidative damage by suppressing NOXs activation in the vascular wall.^[5] Likewise SIRT-1 activation also increased the expression levels of the Nuclear factor-E2 related factor 2 (Nrf2) and its antioxidant target in human endothelial cells.^[6]

Given the crucial role of ROS in arterial stiffness and remodeling, considerable efforts have been made to discover therapies to reduce oxidative stress in the vascular tissue. In this regard, dietary flavonoids constitute a large class of natural antioxidant compounds with demonstrated beneficial actions against several chronic diseases, including cardiovascular diseases.^[7] The favourable effect of flavonoids on arteries is emerging and it has been recently described that flavonoids could be associated with improved measures of vascular function, and in particular with arterial stiffness.^[8] Accordingly, cocoa flavanols have been related to numerous cardioprotective effects, including lowering of blood pressure (BP),^[9] anti-inflammatory^[10] and anti-atherosclerotic effects,^[11] as well as antidiabetic actions.^[12]

1. Introduction

Cardiovascular disease is the leading cause of morbidity and mortality in patients with type 2 diabetes (T2D).^[1] Diabetic macrovascular complications are associated with functional and structural changes in the vascular wall, resulting in early arterial stiffness and remodeling.^[2] Aortic stiffness is considered a marker of vascular dysfunction and a major predictor of poor cardiovascular outcomes.^[2] Therefore, alleviation of vascular stiffness is an important therapeutic target to reduce cardiovascular risk in diabetic patients.

therapies to reduce oxidative stress in the vascular tissue. In this regard, dietary flavonoids constitute a large class of natural antioxidant compounds with demonstrated beneficial actions against several chronic diseases, including cardiovascular diseases.^[7] The favourable effect of flavonoids on arteries is emerging and it has been recently described that flavonoids could be associated with improved measures of vascular function, and in particular with arterial stiffness.^[8] Accordingly, cocoa flavanols have been related to numerous cardioprotective effects, including lowering of blood pressure (BP),^[9] anti-inflammatory^[10] and anti-atherosclerotic effects,^[11] as well as antidiabetic actions.^[12]

D. Álvarez-Cilleros, Dr. L. Goya, Dr. S. Ramos, Dr. M. Á. Martín
Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición
28040 Madrid, Spain
E-mail: amartina@ictan.csic.es

Dr. M. E. López-Oliva
Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid, Spain

Dr. D. Morales-Cano, B. Barreira, Prof. F. Pérez-Vizcaíno
Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina
Universidad Complutense de Madrid
28040 Madrid, Spain

Dr. D. Morales-Cano, B. Barreira, Prof. F. Pérez-Vizcaíno
CIBER de Enfermedades Respiratorias, ISCIII 28029 Madrid, and
Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón
28007 Madrid, Spain

Dr. M. Á. Martín
CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas, ISCIII
28029 Madrid, Spain

The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900044>

DOI: 10.1002/mnfr.201900044

Despite these facts, the effect of cocoa flavanols on arterial function in a situation of high cardiovascular risk such as diabetes remains unclear.

Therefore, this study was aimed at investigating the potential protective effect of a cocoa diet rich in flavanols on functional and structural vascular damage during diabetes and to explore the potential underlying mechanisms. To this end, we have used the Zucker diabetic fatty (ZDF) rats, a widely known and well-established model that displays many of the conditions of T2D in humans. These animals present arterial damage during the progression of the illnesses, making then highly appropriate to evaluate the effect of cocoa on vascular function in T2D.

2. Experimental Section

An extended version of the methods and protocols is included in the Supporting Information.

2.1. Animals and Experimental Design

Animals were treated according to the European (2010/63/EU) and Spanish (RD 53/2013) legislation on Care and Use of Experimental Animals and the experiments were approved by the Ethics Committee from Comunidad de Madrid (PROEX 304/15).

Male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats and their Zucker lean controls (ZL) were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) at 9 weeks of age. Animals were placed under standard controlled conditions ($21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$; 12 h day/night cycle) and after 1 week of acclimation animals were randomly assorted into three different experimental groups (8 animals per group): (1) ZL group: ZL rats received a standard AIN-93G diet, (2) ZDF-C group: ZDF rats received a standard AIN-93G diet and (3) ZDF-Co group: ZDF rats received a cocoa rich diet. Details about cocoa diet composition and dosage regimen are described in the Supporting Information.

2.2. Biochemical Determination

At 20 weeks of age, animals were fasted overnight and blood samples were collected for glucose, insulin, triacylglycerols (TG), total cholesterol (T-Chol), HDL-Chol, and LDL-Chol analysis.

2.3. Glucose Tolerance Test (GTT)

One week before the end of the study, an overload of glucose (2 g per kg b.w.) was i.p. administered in overnight-fasted animals. Blood samples were obtained from the tail vein before and 30, 60, 90, and 120 min after the glucose overload. Glucose was determined using an Accounted Glucose Analyzer (LifeScan España, Madrid, Spain). The integrated glucose response (AUC) over a period of 120 min after glucose overload was also calculated.

2.4. Hemodynamic Measurements and Vascular Reactivity

Rats were anesthetized (80 mg per kg ketamine and 8 mg per kg xylazine i.p.), tracheostomized and ventilated with room air (tidal volume 9 mL kg^{-1} , 60 breaths per min, and a positive end-expiratory pressure of 2 cm H_2O , Nemi Scientific Inc, Medway, USA). Systolic, diastolic, and mean systemic arterial pressures (sSAP, dSAP, and mSAP) were measured by cannulation of the carotid artery in closed chest animals. After completion of hemodynamic measurements rats were euthanized by cardiac puncture and thoracic aortic sections were dissected for the different experiments. Evaluation of vascular reactivity is detailed in the Supporting Information.

2.5. Histological and Immunohistochemical Analyses of Aortic Rings

For histological analysis, aortic samples were fixed in paraformaldehyde (4%), embedded in paraffin, and cut into 4- μm -thick sections. Aorta sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) and media thickness and the internal diameter were measured using image-J software (Fiji image J; 1.52i, NIH, USA). Aortic medial thickness was measured in cross-sections by ten consecutive measurements in a systematic manner to evaluate all segments of the circumference of the aorta. Estimation of the aorta internal diameter was performed by measuring four inner diameters at right angle for each cross-section of the thoracic aorta. At least three different cross-sections of the aorta were analyzed for each rat. The ratio between aortic thickness and the internal diameter was calculated.

2.6. Determination of ROS

ROS were quantified by the DCFH assay based on the oxidation of dichlorofluorescein (DCF) that emits fluorescence.^[13]

2.7. Western Blott Analysis

To detect ERKs, p-ERKs, JNKs, p-JNKs, and NOX-1, NOX-2, and NOX-4, frozen aortic rings were homogenized 1:10 (w:v) in extraction buffer. Aortic homogenates were centrifuged at $14\,000 \times g$ for 60 min. Protein concentration was determined by the Bradford assay and stored at -80°C until use for Western blot analyses.

2.8. Protein Carbonyl Levels

Protein oxidation was measured as carbonyl levels in aortic homogenates. Protein carbonyl content was determined spectrophotometrically following derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine as described.^[14]

2.9. GSH Levels and GPx and GR Activities

The content of reduced glutathione (GSH) was quantitated by fluorometric assay as previously described.^[14] The method is based on the reaction of GSH with OPT at pH 8.0, which generates fluorescence. Determination of GPx activity is based on the oxidation of GSH by GPx, using *tert*-butylhydroperoxide as a substrate, coupled to the disappearance of NADPH by GR.^[14] GR activity was determined by following the decrease in absorbance due to the oxidation of NADPH utilized in the reduction of oxidized glutathione.^[14]

2.10. Statistical Analysis

Data were tested for normality and homogeneity of variances by the D'Agostino and Pearson and Levene tests, respectively; for multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by a Bonferroni test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. The level of significance was $p < 0.05$. A SPSS 23.0 version program was used.

3. Results and Discussion

In this work, we investigated whether cocoa intake may prevent the alterations on hemodynamics, arterial stiffness, and vascular remodeling during diabetes and the potential mechanism involved. To this end, we have used Zucker diabetic rats that were fed on a cocoa-rich diet (ZDF-Co) from weeks 10 to 20 of life and their respective controls fed on standard diet (ZDF-C). During the study period, food intakes and body weight increased significantly in both diabetic groups (ZDF-C and ZDF-Co) compared to non-diabetic ZL animals, confirming the hyperphagic and obese state of male ZDF rats. However, the body weight of animals fed on the cocoa diet (ZDF-Co) was slightly but significantly reduced (about 10 %) despite the fact that they had food intakes similar to their corresponding ZDF-C animals (Table 1). Likewise, both ZDF groups showed hyperglycaemia, hyperinsulinaemia, and glucose intolerance (AUC) compared to ZL rats, which also confirmed their diabetic state. Interestingly, the severity of these metabolic disorders was clearly reduced by the cocoa diet and, consequently, the levels of HbA1c and insulin resistance (HOMA-IR) were significantly improved in ZDF-Co as compared to the ZDF control animals (Table 1). We have previously showed the potential anti-diabetic effect of cocoa intake in a pre-diabetic state^[14] and the current study extends these findings to demonstrate that cocoa is also able to improve glucose metabolism in fully diabetic ZDF rats. In contrast, T-Cho, HDL-Cho, LDL-Cho, and TG levels were significantly elevated in both ZDF-C and ZDF-Co rats in comparison to the ZL group, indicating that cocoa diet was unable to improve lipid profile in 20-weeks old diabetic ZDF rats (Table 1).

T2D is associated with functional and structural damages to the arterial wall that result in macrovascular complications and cardiovascular disease.^[2] Several interventional studies strongly suggest a potential role of cocoa intake in the maintenance of

Table 1. Biological parameters of 20-week-old Zucker lean rats (ZL), Zucker diabetic fatty rats fed with control diet (ZDF-C), and Zucker diabetic fatty rats fed with cocoa diet (ZDF-Co).

	ZL	ZDF-C	ZDF-Co
Body weight [g]	329 ± 4 ^a	444 ± 8 ^b	400 ± 12 ^c
Food intake [g]	1223 ± 61 ^a	1839 ± 74 ^b	1918 ± 107 ^b
Glycemia [mM]	4.80 ± 0.50 ^a	13.20 ± 0.40 ^b	6.50 ± 0.60 ^c
Insulinemia [ng mL ⁻¹]	0.40 ± 0.02 ^a	4.36 ± 0.50 ^b	1.14 ± 0.22 ^c
HbA1c [%]	4.38 ± 0.19 ^a	10.40 ± 1.58 ^b	6.09 ± 0.79 ^c
AUC [mmol L ⁻¹ min ⁻¹]	1803 ± 96 ^a	4044 ± 608 ^b	3049 ± 339 ^c
HOMA IR	2.60 ± 0.20 ^a	90.96 ± 14.26 ^b	12.22 ± 1.36 ^c
Cholesterol [mmol L ⁻¹]	2.16 ± 0.26 ^a	6.29 ± 0.41 ^b	6.56 ± 0.52 ^b
HDL [mmol L ⁻¹]	2.27 ± 0.22 ^a	2.85 ± 0.37 ^b	3.08 ± 0.32 ^b
LDL [mmol L ⁻¹]	0.92 ± 0.09 ^a	2.28 ± 0.33 ^b	3.08 ± 0.32 ^b
Triglycerides [mmol L ⁻¹]	0.39 ± 0.09 ^a	2.74 ± 0.24 ^b	2.87 ± 0.31 ^b

Data represent the means ± SD of 6–8 animals. ^{a,b,c} Means in a row without a common letter differ, $p < 0.05$.

optimal vascular condition in healthy individuals and in situations of cardiovascular risk such as hypercholesterolemia and hypertension^[9] or during normal aging.^[15] Consequently, in the present study we evaluated the potential protective effect of cocoa on vascular stiffness and remodeling in a situation of high cardiovascular risk such as diabetes. To this end, hemodynamic parameters like arterial pressure and heart rate as well as markers of arterial stiffness like pulse pressure (PP) and augmentation index (AI), were evaluated in diabetic animals (Figure 1A–D). We observed a significant increase in systolic, diastolic, and mean systemic arterial pressure as well as PP in ZDF-C rats, indicating arterial stiffness which is consistent with the literature on experimental and clinical T2D.^[16] PP is a widely accessible indicator of arterial stiffness and its increase predicts a higher risk of cardiovascular events.^[17] ZDF-C rats also showed decreased heart rate as compared with ZL. Interestingly, all these effects were significantly abolished by cocoa intake. Furthermore, as shown in Figure 1E, in non-diabetic ZL rats, the peak pressure of the forward wave was smaller than the reflected wave, which is often referred as Murgo type C wave, characteristic of young and healthy subjects, and therefore the augmentation index was negative. In contrast, ZDF-C rats showed increased reflected wave (Murgo type A wave), characteristic of old and hypercholesterolemic subjects^[18] with positive augmentation index, suggestive again of increased stiffness. The shape of the pressure wave in ZDF-Co rats returned to the profile of ZL in most rats showing this group a near zero average augmentation index. Altogether, our results indicate that cocoa intake prevented increased blood pressure and aortic stiffness in ZDF diabetic animals. This vascular protective effect of cocoa has also been demonstrated in similar experimental models of cardiovascular risk such as hypertension^[19] and supported several small interventional studies suggesting that cocoa may also have therapeutic potential in preventing cardiovascular complications in diabetic patients.^[20]

Since arterial stiffness usually precedes endothelial dysfunction, we also evaluated the response to vasodilators in isolated aorta rings. Nevertheless, there were no differences in the concentration–response curves for the vasodilator responses

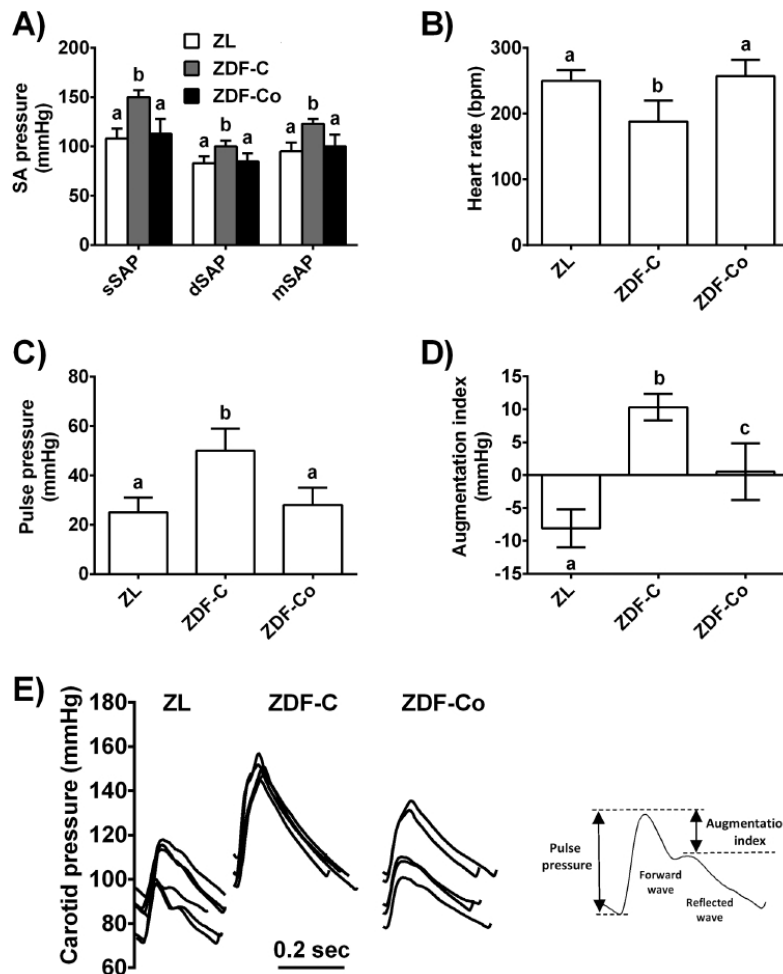


Figure 1. Hemodynamic status of Zucker lean (ZL), Zucker diabetic rats fed control diet (ZDF-C), and Zucker diabetic rats fed a cocoa diet (ZDF-Co). A) Systolic, diastolic, and mean systemic arterial pressures. B) Pulse pressure. C) Heart rate. D) Augmentation index. E) Original recordings of the carotid arterial pressure wave. Each trace is from a different rat. The inset shows how the augmentation index was measured. Data from A–D are means \pm SEM of 5–7 animals. Means without a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

to the endothelium-dependent (acetylcholine) or -independent (sodium nitroprusside) agonists between the three groups (Figure S1A,B, Supporting Information), indicating that endothelial function was unaffected in ZDF diabetic rats. As previously shown,^[21] moderate hyperglycaemia can be enough to induce adverse structural changes in the vasculature but more severe hyperglycaemia is essential to cause endothelial dysfunction. Consequently, a longer period of diabetes seems to be necessary to induce endothelial dysfunction in ZDF animals.

Increased stiffness results from alterations in the composition and structure of the arterial wall; therefore, we next investigated vascular remodeling in thoracic aortas of ZL and ZDF animals.

Several mechanisms are involved in this process including hyperplasia of the arterial intima and media, changes in vascular collagen, and elastin or arterial calcifications.^[22] Accordingly, ZDF-C diabetic rats exhibited a significant increase in aortic medial thickness and in the ratio between aortic thickness and the internal diameter (Figure 2A,B), indicating intima hyperplasia and vascular smooth muscle cell hypertrophy.^[22] More importantly, the elastin content in aortas from ZDF-C animals was significantly reduced (Figure 2C,D) while collagen accumulation increased, resulting in prominently lower elastin to collagen ratio (E/C) in the media (Figure 2E,F). Especially, this decrease represented the decline in arterial compliance and advance in

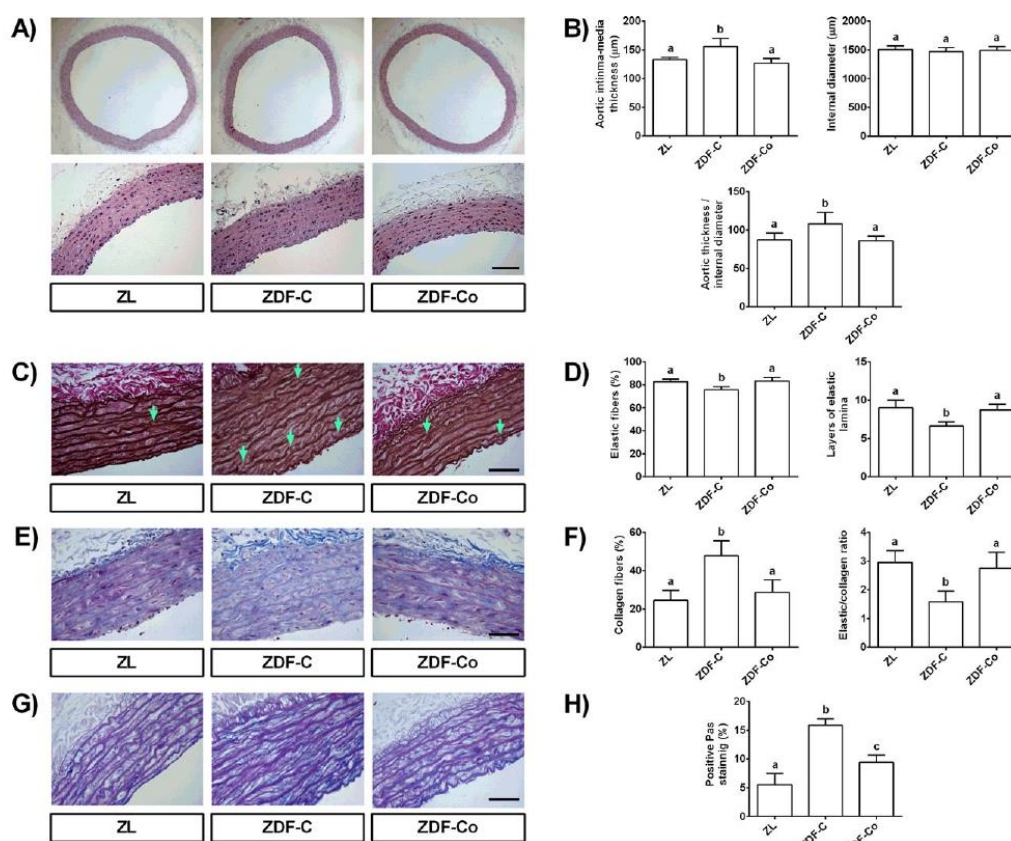


Figure 2. Histological analyses of aortas from Zucker lean (ZL), Zucker diabetic rats fed control diet (ZDF-C), and Zucker diabetic rats fed a cocoa diet (ZDF-Co). A) Representative sections of thoracic aortas stained with H&E (scale bars: 50 μm and 20 μm). B) Quantitative analysis of aortic medial thickness, internal diameter, and the ratio between aortic thickness and the internal diameter. C) Representative images of collagen fibres shown by Masson's trichrome staining (blue-stained). D) Quantitative analysis of elastin fibres and layers of elastic laminae. Scale bar 10 μm. E) Representative images of elastic fibres shown by Verhoeff–Van Gieson staining (dark brown). Elastic fragmentation was characterized by destruction and disruption (black arrows) of elastin lamellae. Scale bar 10 μm. F) Quantitative analysis of collagen fibres and elastin–collagen ratio. G) Representative images of proteoglycans by PAS staining (magenta). H) Quantitative analysis of positive PAS staining. Values are expressed as mean ± SEM. *n* = 6–8. Means without a common letter differ significantly, *p* < 0.05.

arterial stiffness.^[23] Furthermore, the layered architecture of elastic lamellae was found to be disrupted and fragmented (black arrows) and the loss of interlamellar elastic fibres within the aortic media layer resulted in leaving gaps partially filled with collagen and proteoglycans that were significantly increased in ZDF-C diabetic rats (Figure 2G,H). Importantly, all these adverse structural modifications induced by diabetes were fully prevented in diabetic rats fed with cocoa, supporting the protective effect in arterial stiffness observed in ZDF-Co rats. Altogether, these interesting novel findings reveal the beneficial effect of cocoa intake in improving vascular structural changes and remodeling in ZDF rats. Although, interventional studies evaluating the consumption of cocoa products in T2D patients are very limited, results from some small human studies have also showed a protective ef-

fect of cocoa intake on vascular function.^[20] Therefore, additional clinical trials in individuals with diabetes are needed in order to clarify the potential of cocoa to reduce the risk of vascular complications in diabetics.

It is widely accepted that oxidative stress plays a central role in the pathogenesis of vascular stiffening and remodeling and vascular oxidative stress has been consistently demonstrated in experimental models and patients with diabetes.^[24,25] There are several sources of ROS in the vascular wall including the NOXs family, enzymes of the mitochondrial respiratory chain or xanthine oxidase. However, high glucose and diabetic conditions are known to increase ROS production mainly via activation of NOXs, especially NOX-1, NOX-2, and NOX-4.^[26] According to that, we found that diabetic ZDF-C rats presented

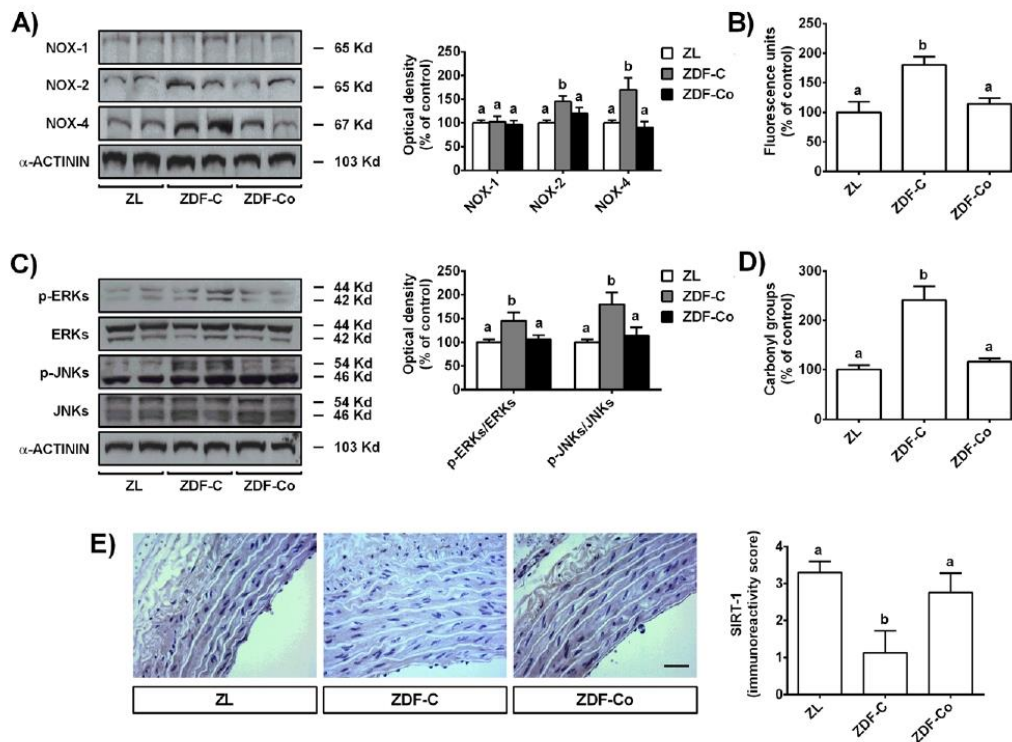


Figure 3. Oxidative status in aortas from Zucker lean (ZL), Zucker diabetic rats fed control diet (ZDF-C), and Zucker diabetic rats fed a cocoa diet (ZDF-Co). A) Representative Western blot of total NOX-1, NOX-2, and NOX-4 in aortic homogenates and percentage levels relative to the control condition. B) Percentage levels of ROS relative to the control condition. C) Representative Western blot of phosphorylated and total ERKs and JNKs in aortic homogenates and percentage levels relative to the control condition. D) Percentage levels of carbonyl groups relative to the control condition. E) Representative photographs for immunohistochemical staining of SIRT1 (brown-stained) and immunoreactivity score. Scale bar: 10 μ m. Data represent means \pm SEM of 6–8 samples per condition. Equal loading of Western blots was ensured by α -actinin. Means without a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

increased NOX-2 and NOX-4 levels and ROS generation in aorta tissues (Figure 3A,B). However, cocoa intake significantly down-regulated NOX-2 and NOX-4 protein expressions and decreased vascular ROS levels in diabetic animals. Likewise, the activation of signaling pathways closely related to oxidative damage, such as ERKs and JNKs, were totally prevented in arteries from ZDF-Co rats (Figure 3C). As a result, arterial oxidative injury, as indicated by increased ROS, NOX-2, and NOX-4 and protein carbonyl levels (Figure 3D), was noted in diabetic ZDF-C rats but not in those fed with cocoa (ZDF-Co). Notably, diabetic ZDF-C rats also showed a significant decrease in the levels of sirtuin-1 (SIRT-1) (Figure 3E). SIRT-1 has been shown to protect against ROS-mediated oxidative damage in arteries by suppressing NADPH oxidase activation.^[6] In fact, inhibition of SIRT-1 significantly increased vascular superoxide production and enhanced NADPH oxidase activity and mRNA expression of NOX-4 in aortic rings.^[6] Interestingly, we showed here that cocoa intake strongly prevented SIRT-1 depletion induced by diabetes, probably contributing to the down-regulation of NOX-2 and NOX-4 levels in the

aorta of ZDF animals. These findings are consistent with previous in vitro studies showing that one of the main cocoa flavanols, epicatechin (EC), and the cocoa colonic metabolite 3,4-dihydroxyphenylacetic acid prevented the activation of NOX-4 and the decrease of SIRT-1 levels induced by a high glucose challenge in renal tubular cells.^[27] More importantly, it has been recently showed that EC prevented SIRT-1 decreases induced by aging and reverses the loss of vascular function both in aortas from aged animals and in aged bovine coronary artery endothelial cells.^[28] Altogether, the present results demonstrate that cocoa intake prevents the vascular oxidative injury induced by diabetes. Since cocoa reduced the levels of NOXs and ROS and prevented SIRT-1 depletion induced by diabetes, we suggest that this could be one of the pathways that contribute to decrease oxidative stress damage in arteries from ZDF rats. This antioxidant effect of cocoa may explain the improvement in blood pressure, aortic remodeling, and insulin sensitivity found in the diabetic animals.^[29] Likewise, the demonstrated anti-diabetic effects of cocoa flavanols^[12] can directly reduce hyperglycaemia and improve

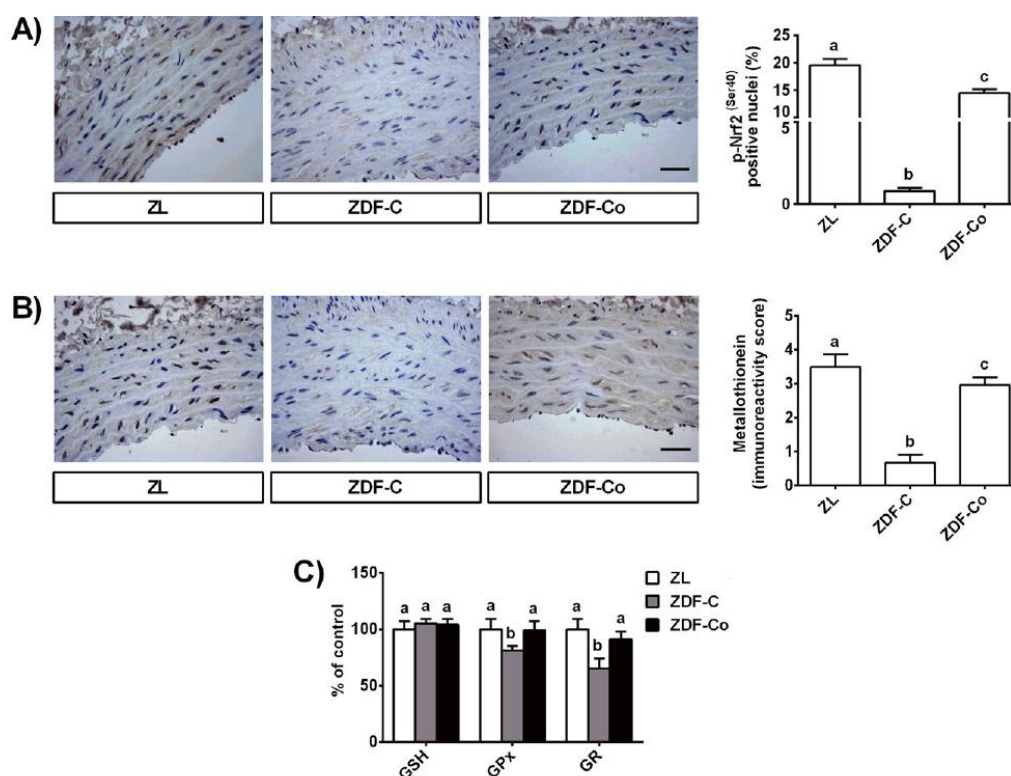


Figure 4. Nrf2 expression and intracellular antioxidants in aortas from Zucker lean (ZL), Zucker diabetic rats fed control diet (ZDF-C), and Zucker diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). A) Representative photographs for immunohistochemical staining of p-Nrf2 (brown-stained). p-Nrf2 is expressed as percentage of positive nucleus relative to total nuclei. Scale bar: 10µm. B) Representative photographs for immunohistochemical staining of MT (brown-stained) and immunoreactivity score. Scale bar: 10µm. C) Percentage levels of GSH and GPx and GR activities relative to the control condition. Data represent means \pm SEM of 6–8 samples per condition. Means without a common letter differ significantly, $p < 0.05$.

glucose tolerance, also contributing to reduce the risk of vascular damage.

Diabetic milieu not only increases ROS generation but also attenuates the levels of intracellular antioxidants and compromises the antioxidant defence enzymes in aortas. Accordingly, we found that oxidative stress in arteries from ZDF-C rats was associated with decreased nuclear levels of p-Nrf2 (Figure 4A), a transcription factor that plays an important role in anti-oxidative responses by up-regulating multiple antioxidant components.^[30] Consequently, the antioxidant defense system was depleted in aortas from ZDF-C diabetic rats, as levels of metallothionein (MT) (Figure 4B) and the activity of antioxidant enzymes such as GPx and GR (Figure 4C) were considerably reduced. Once again, cocoa diet significantly prevented Nrf2 inactivation in aortas and their down-stream antioxidants were restored to the level of the non-diabetic control. MT is a potent antioxidant protein that has been reported to protect against diabetes-induced cardiovascular and renal pathogenic alterations in animal diabetic models.^[31] Moreover, decreased MT levels have been associated with aortic pathologic damages, including aortic remodeling and

oxidative stress.^[31] Notably, our results are in concordance with those demonstrating that increased MT via up-regulation of Nrf2 plays a prominent role in the prevention of diabetic nephropathy and cardiomyopathy by the natural compound sulforaphane.^[32,33] Taken together, these outcomes indicate that cocoa diet avoids diabetes-induced depletion of Nrf2 and their antioxidants enzymes, mainly MT, contributing to prevent oxidative stress and vascular injury in diabetic rats. Although the role of Nrf2 in diabetes is not fully understood, it has been indicated that decreased Nrf2 activity in arteries contributes to oxidative stress and favours vascular remodeling and dysfunction in diabetes.^[34] Accordingly, the increase of Nrf2 activity by several activators has been considered as a promising approach for preventing the development of vascular complications in diabetes. However, constitutive activation of Nrf2 has been also found in a variety of cancers;^[35] therefore, additional studies about the role of Nrf2 activation in specific tissues are necessary to better understand the multiple roles of Nrf2 in diabetes.

Finally, it is interesting to note that health promoting properties of cocoa are mainly attributed to its flavanol compounds

(epicatechin and procyanidins) and methylxanthines (theobromine). More specifically, it has been suggested that epicatechin and procyanidins, respectively, are the main components responsible for the acute and long-term vascular effects of cocoa.^[36] On the contrary, the consumption of theobromine alone did not result in significant effects but ingested simultaneously with cocoa flavanols enhanced their vascular effects.^[37]

4. Concluding Remarks

In conclusion, the present work demonstrates for the first time the protective effect of regular cocoa intake on vascular damage in a rat model of T2D and the likely mechanisms involved. The beneficial effects of cocoa include amelioration of glucose metabolism, improvement of hemodynamic status, and the prevention of aortic stiffening and remodeling in diabetes. At the molecular level, cocoa prevented SIRT-1 depletion induced by diabetes, down-regulated NOX-4 and NOX-2 levels, and reduced ROS generation in the arteries of diabetic animals. Likewise, the decreased levels of active Nrf2 and their associated antioxidants were also prevented by cocoa, collaborating in avoiding oxidative stress and vascular injury in diabetic rats. Overall, these findings indicate a novel mechanism to alleviate cardiovascular risk in the diabetic population and support the potential use of cocoa to protect or delay the progression of vascular complications in diabetes.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

This work was supported by grants AGL 2015–67087-R and SAF2016-77222-R (MINECO/FEDER, UE) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MINECO). D.Á.-C. is a FPI fellow from the predoctoral program of MINECO (BES-2016-076721). D.Á.-C. carried out the experiments and analysed the data. M.E.L.-O. performed and interpreted the histological analysis. F.P.-V., D.M.-C., and B.B. developed and interpreted the hemodynamic and vascular reactivity studies. L.G. contributed to the critical revision of the manuscript. S.R. highly contributed to the conception and design of the study. M.A.M. conceived and designed the study and wrote the manuscript with significant contributions from all other authors.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

aortic stiffening, cocoa diet, obesity, polyphenols, Zucker diabetic fatty rats

Received: January 11, 2019

Revised: May 8, 2019

Published online:

- [1] S. P. Jansson, D. K. Andersson, K. Svardsudd, *Diabetes Care*, **2010**, *33*, 551.
- [2] M. Kozakova, C. Palombo, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2016**, *13*, 201.
- [3] A. Konior, A. Schramm, M. Czesnikiewicz-Guzik, T. J. Guzik, *Antioxid. Redox Signal* **2014**, *20*, 2794.
- [4] Z. Liu, C. Jiang, J. Zhang, B. Liu, Q. Du, *J. Diabetes* **2016**, *8*, 324.
- [5] M. J. Zarzuelo, R. López-Sepúlveda, M. Sánchez, M. Romero, M. Gómez-Guzmán, Z. Ungvary, F. Perez-Vizcaino, R. Jimenez, J. Duarte, *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85*, 1288.
- [6] X. Li, G. Wu, F. Han, K. Wang, X. Bai, Y. Jia, Z. Li, W. Cai, W. Zhang, L. Su, D. Hu, *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *661*, 117.
- [7] A. Rodríguez-Mateos, D. Vauzour, C. G. Krueger, D. Shanmuganayagam, J. Reed, L. Calani, P. Mena, D. Del Rio, A. Crozier, *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1803.
- [8] M. Lilamand, E. Kelaïditi, S. Guyonnet, R. A. Incalzi, A. Raynaud-Simon, B. Vellas, M. Cesari, *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2014**, *24*, 698.
- [9] C. Ferri, G. Desideri, L. Ferri, I. Proietti, S. Di Agostino, L. Martella, F. Mai, P. Di Giosia, D. Grassi, *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 9901.
- [10] Y. Gu, J. D. Lambert, *Mol. Nutr. Food Res.* **2013**, *57*, 948.
- [11] I. Zanotti, M. Dall'Asta, P. Mena, L. Mele, R. Bruni, S. Ray, D. Del Rio, *Food Funct.* **2015**, *6*, 13.
- [12] M. A. Martín, L. Goya, S. Ramos, *Mol. Nutr. Food Res.* **2016**, *60*, 1756.
- [13] I. Cordero-Herrera, M. A. Martín, L. Goya, S. Ramos, *Food Res. Int.* **2015**, *69*, 194.
- [14] E. Fernandez-Millan, I. Cordero-Herrera, S. Ramos, F. Escrivá, C. Álvarez, L. Goya, M. A. Martín, *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, *59*, 820.
- [15] C. Heiss, R. Sansone, H. Karimi, M. Krabbe, D. Schuler, A. Rodríguez-Mateos, T. Kraemer, M. M. Cortese-Krott, G. G. C. Kuhnle, J. P. E. Spencer, H. Schroeter, M. W. Merx, M. Kelm, *AGE* **2015**, *37*, 56.
- [16] E. Cosson, P. Valensi, D. Laude, D. Mesangeau, H. Dabire, *Diabetes Metab.* **2009**, *35*, 364.
- [17] M. A. Said, R. N. Eppinga, E. Lipsic, N. Verweij, P. van der Harst, *J. Am. Heart Assoc.* **2018**, *22*, e007621.
- [18] I. B. Wilkinson, K. Prasad, I. R. Hall, A. Thomas, H. MacCallum, D. J. Webb, M. P. Frenneaux, J. R. Cockcroft, *J. Am. Coll. Cardiol.* **2002**, *39*, 1005.
- [19] M. D. Paredes, P. Romecin, N. M. Atucha, F. O'Valle, J. Castillo, M. C. Ortiz, J. García-Esteban, *Nutrients* **2018**, *16*, 10.
- [20] S. R. Shah, R. Alweis, N. I. Najim, A. M. Dharani, M. A. Jangda, M. Shahid, A. N. Kazi, S. A. Shah, *J. Community Hosp. Intern. Med. Perspect.* **2017**, *7*, 218.
- [21] N. Kahlberg, C. X. Qin, J. Anthonisz, E. Jap, H. H. Nga, M. Jelinic, L. J. Parry, B. K. Kemp-Harper, R. H. Ritchie, C. H. Leo, *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 325.
- [22] B. J. vanVarik, R. J. M. W. Rennenberg, C. P. Reutelingsperger, A. A. Kroon, P. W. de Leeuw, L. J. Schurgers, *Front. Genet.* **2012**, *13*, 290.
- [23] E. Salum, M. Butlin, J. Kals, M. Zilmer, J. Eha, A. P. Avolio, A. Arend, M. Aunapuu, P. Kampus, *Diabetol. Metab. Syndr.* **2014**, *6*, 57.
- [24] M. A. Silva, T. Bruder-Nascimento, S. B. Cau, R. A. Lopes, F. L. Mestriner, R. S. Fais, R. M. Touyz, R. C. Tostes, *Front. Physiol.* **2015**, *6*, 269.
- [25] D. Jay, H. Hitomi, K. K. Griendling, *Free Radical Biol. Med.* **2006**, *40*, 183.
- [26] A. B. García-Redondo, A. Aguado, A. M. Briones, M. Salices, *Pharmacol. Res.* **2016**, *114*, 110.
- [27] D. Álvarez-Cilleros, M. A. Martín, L. Goya, S. Ramos, *J. Funct. Foods* **2018**, *46*, 19.
- [28] I. Ramirez-Sanchez, C. Mansour, V. Navarrete-Yañez, M. Ayala-Hernandez, G. Guevara, C. Castillo, M. Loredo, M. Bustamante, G. Ceballos, F. J. Villarreal, *Food Funct.* **2018**, *9*, 4802.

- [29] V. Ludovici, J. Barthelmes, M. P. Nägele, F. Enseleit, C. Ferri, A. J. Flammer, F. Ruschitzka, I. Sudano, *Front. Nutr.* **2017**, *4*, 36.
- [30] A. L. Egger, K. A. Gay, A. D. Mesecar, *Mol. Nutr. Food Res.* **2008**, *52*, S84.
- [31] X. Miao, Y. Wang, J. Sun, W. Sun, Y. Tan, L. Cai, Y. Zheng, G. Su, Q. Liu, Y. Wang, *Cardiovasc. Diabetol.* **2013**, *12*, 54.
- [32] H. Wu, L. Kong, Y. Cheng, Z. Zhang, Y. Wang, M. Luo, Y. Tan, X. Chen, L. Miao, L. Cai, *Free Radical Biol. Med.* **2015**, *89*, 431.
- [33] J. Gu, Y. Cheng, H. Wu, L. Kong, S. Wang, Z. Xu, Z. Zhang, Y. Tan, B. B. Keller, H. Zhou, Y. Wang, Z. Xu, L. Cai, *Diabetes* **2017**, *66*, 529.
- [34] R. M. Da Costa, D. Rodrigues, C. A. Pereira, J. F. Silva, J. V. Alves, N. S., Lobato, R. C. Tostes, *Front. Pharmacol.* **2019**, *10*, 382.
- [35] S. Wu, H. Lu, Y. Bai, *Cancer Med.* **2019**, *8*, 2252.
- [36] M. Urpi-Sarda, M. Monagas, N. Khan, R. Llorach, R. M. Lamuela-Raventós, O. Jáuregui, R. Estruch, M. Izquierdo-Pulido, C. Andrés-Lacueva, *J. Chromatogr. A* **2009**, *43*, 7258.
- [37] R. Sansone, J. I. Ottaviani, A. Rodriguez-Mateos, Y. Heinen, D. Noske, J. P. Spencer, A. Crozier, M. W. Merx, M. Kelm, H. Schroeter, C. Heiss, *Am. J. Clin. Nutr.* **2016**, *105*, 352.

Supporting information:

Dietary cocoa prevents aortic remodeling and vascular oxidative stress in diabetic rats.

David Álvarez-Cilleros¹, María Elvira López-Oliva², Daniel Morales-Cano^{3,4}, Bianca Barreira^{3,4}, Francisco Pérez-Vizcaino F^{3,4}, Luis Goya¹, Sonia Ramos¹, María Ángeles Martín^{1,5*}

1.- Material and Methods

1.1. Materials and Chemical

Nicotine adenine dinucleotide reduced salt, nicotine adenine dinucleotide phosphate reduced salt (NADPH), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH), reduced glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), *tert*-butylhydroperoxide, *o*-phthaldehyde, phenylephrine, acetylcholine, sodium nitroprusside, streptavidin-biotin conjugated horseradish peroxidase (HRP), 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) and glucose were purchased from Sigma Chemical (Madrid, Spain). Anti-ERK1/2 and antiphospho-ERK1/2, anti-JNK1/2 and antiphospho-JNK1/2 were obtained from Cell Signalling Technology (Izasa, Madrid, Spain). Anti-NOX-4 (sc-30141), anti-Metallothionein (MT) (sc-11377), anti-SIRT-1 (sc-74465) and anti- α -actinin (sc-17829) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Quimigen, Madrid, Spain). Anti-NOX-1 and ANTI-NOX-2 were purchased from Abcam (Cambridge, UK). Antiphospho-Nrf2 (#12811) was purchased from Signalway antibody (Quimigen, Madrid, Spain). Materials and chemicals for electrophoresis and the Bradford reagent were from BioRad (BioRad Laboratories S.A., Madrid, Spain).

1.2. Cocoa diet and dosage regimen

Cocoa rich diet (10%) was produced by adding 100 g/kg of natural Forastero cocoa powder (a kind gift from Idilia Foods, Barcelona, Spain) to AIN-93G diet. The composition of the diets is given in *Supplementary Table 1*. During the 10 weeks of the experiment, food and water were available *ad libitum*. The total polyphenol content of the cocoa was determined by the spectrophotometric method of Folin–Ciocalteu using gallic acid as the standard and main cocoa flavonoids and theobromine were determined by LC-MS as previously described (1). A similar cocoa supplementation has shown beneficial effects against oxidative stress in pre-diabetic rats (2,3). The amount of cocoa employed in the present animal study is equivalent to a daily dose of 1200 mg polyphenols, for a 60 kg human. This phenolic intake is considered realistic and it could be provided by 15 g of high-flavanol cocoa powder (80mg/g).

1.3. Biochemical determinations

Glucose was determined using an Accounted Glucose Analyzer (LifeScan España, Madrid, Spain) and insulin and glycosylated hemoglobin (HbA1c) were quantified by ELISA kits (Rat Insulin, Mercodia, Uppsala, Sweden; HbA1c Kit Spinreact, BioAnalitica, Madrid, Spain). The insulin resistance index [homeostasis model assessment (HOMA)-IR] was also calculated. Triacylglycerols (TG), total cholesterol (T-Cho), HDL-Cho and LDL-Cho were determined in serum as described elsewhere (3).

1.4. Evaluation of vascular reactivity

Aortic rings (diameter ~2 mm and length ~3-4 mm) were mounted in Krebs solution at 37°C gassed with a 21% O₂-5% CO₂ mixture in an organ bath. After

Resultados – Capítulo segundo

stretching to give 2 g of resting tension, vessels were sequentially exposed to KCl (80 mmol/L) and phenylephrine (1 nmol/L-10 μ mol/L) as vasoconstrictor agents. Rings were washed 3 times with drug-free Krebs solution and allowed to recover for 30 min. Finally, rings were contracted with a concentration of phenylephrine titrated to induce a contraction 75% of the response to KCl and concentration–response curves to acetylcholine (1 nmol/L-10 μ mol/L) or sodium nitroprusside (0.1 nmol/L–1 μ mol/L) were performed by cumulative addition

1.5. Immunohistochemical determinations and quantitative analysis

To quantify elastin and collagen density, aorta sections were stained with Verhoeff-van Gieson and Masson's Trichrome staining, respectively, according to the standard protocols. Images were obtained under light microscopy and quantified with ImageJ software using color deconvolution plugin. Collagen and elastin deposition were expressed as percentage of positively stained area to total area. Collagen/elastin ratio was calculated.

For the immunohistochemical staining, antibodies against SIRT-1, phospho-Nrf2 and MT were used. Serial aortic sections were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C, then incubated with HRP-conjugated secondary antibody and revealed with DAB substrate as chromogen and Haematoxylin. SIRT-1 and MT expression were evaluated by their staining pattern: weak (1), moderate (2), diffuse (3) and intense (4). The percent of phospho-Nrf2 positive nuclei was calculated as the number of positive nuclei x 100/ total number of nuclei. Six sections per group were analysed.

1.6 Determination of ROS

Briefly, aortic homogenates were diluted 1:20 (v/v) with ice-cold Locke's buffer and incubated with 5 μ M DCFH for 30 min at 37 °C. Fluorescence was measured in a microplate reader at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm (Bio-Tek, Winooski, VT) (4).

1.7 Western blot analysis

Equal amounts of protein (50 μ g) were separated by SDS–PAGE and transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) filters (Protein Sequencing Membrane). Membranes were probed with the corresponding primary antibody followed by incubation with peroxide-conjugated antirabbit Ig (GE Healthcare, Madrid, Spain). Blots were developed with the ECL system (GE Healthcare, Madrid, Spain). Normalization of Western blot was ensured by α -actinin and band quantification was carried out with a scanner and the Scion Image software.

1.8 Protein carbonyl levels

Aortic rings were homogenized (1:5 w/v) in 0.25 M Tris, 0.2 M sucrose and 5 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) buffer pH 7.4 and centrifuged at 3000g for 15 min. Absorbance was measured at 360 nm and carbonyl content was expressed as nmol/mg protein using an extinction coefficient of 22000 nmol L⁻¹ cm⁻¹ (4).

1.9 GSH levels and GPx and GR activities

For the determination of GSH, aortic rings were homogenized (1:20 w/v) in 50 mM phosphate buffer pH 7.0, proteins precipitated with 5% trichloroacetic acid and then centrifuged for 30 min at 10000g. Fluorescence was measured at an excitation

Resultados – Capítulo segundo

wavelength of 340 nm and emission wavelength of 460 nm. For the determination of GPx and GR activity, aortic rings were homogenized (1:5 w/v) in 0.25 M Tris, 0.2 M sucrose and 5 mM 1,4-dithiothreitol (DTT) buffer pH 7.4 and centrifuged at 3000g for 15 min (4).

2.- References

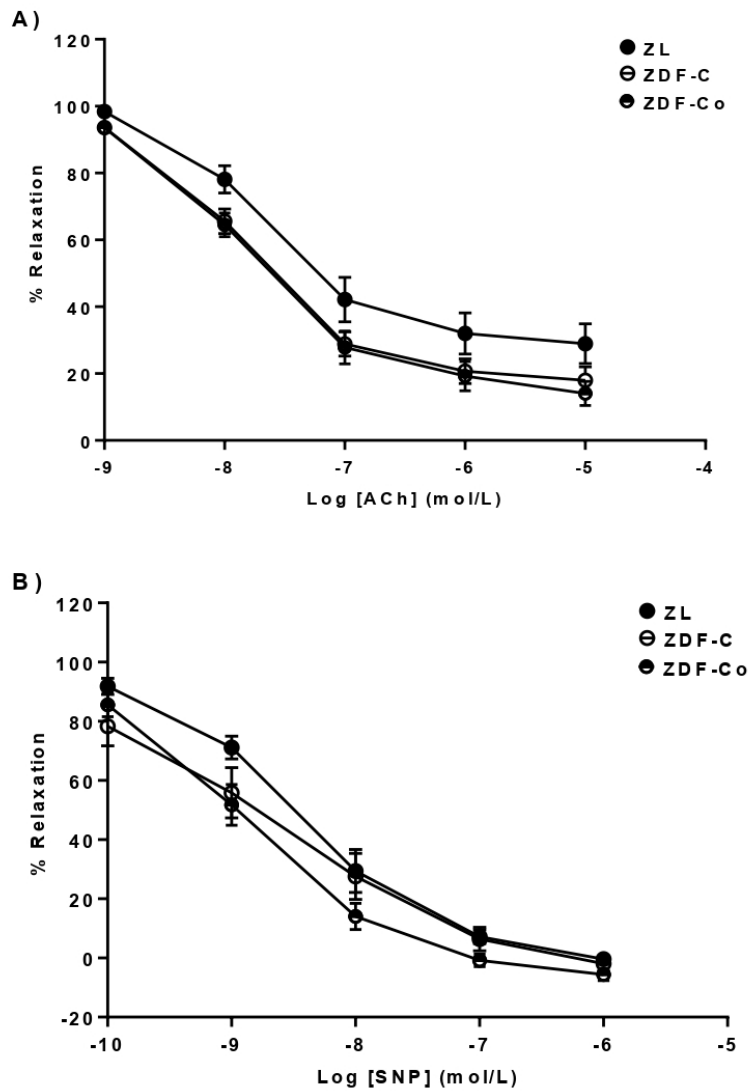
- 1.- Martín, M.A., Ramos, S., Mateos, R., Granado-Serrano, A.B., Izquierdo-Pulido, M., Bravo, L., Goya, L. Protection of Human HepG2 Cells against Oxidative Stress by Cocoa Phenolic Extract. *J Agric Food Chem.* 2008, 56, 7765-7772.
- 2.- Fernández-Millán, E., Cordero-Herrera, I., Ramos, S., Escrivá, F., Álvarez, C., Goya, L., Martín, M.A., Cocoa-rich diet attenuates beta cell mass loss and function in young Zucker diabetic fatty rats by preventing oxidative stress and beta cell apoptosis. *Mol. Nutr. Food Res.* 2015, 59, 820–824.
- 3.- Cordero-Herrera, I., Martín, M.A., Fernández-Millán, E., Álvarez, C., Goya, L., Ramos, S. *J Funct. Foods* **2015**, 17, 761.
- 4.- Fernández-Millán, E., Cordero-Herrera, I., Ramos, S., Escrivá, F., Álvarez, C., Goya, L., Martín, M.A. *Mol. Nutr. Food Res.* **2015**, 59, 820.

Supplementary Table 1. Composition of the experimental control and cocoa-rich diets

Component (g/kg dry weight)	Control	Cocoa
Casein	140	140
Dextrose	155	155
Sucrose	100	100
Fat	40	40
t-BHQ (<i>tert</i> -butylhydroquinone)	0.008	0.008
Mineral mix.	35	35
Vitamin mix.	10	10
L-Cys	1.8	1.8
Cholin bitartrate	2.5	2.5
Cellulose	100	66
Starch	415.7	349.7
Cocoa powder	-	100
Total cocoa polyphenols	-	2.4
Cocoa flavonoids ^b		
Procyanidin B1	-	0.035
Catechin	-	0.115
Procyanidin B2	-	0.132
Epicatechin	-	0.382
Theobromine	-	0.742

Resultados – Capítulo segundo

Supplementary Figure 1 Endothelium-dependent responses to Ach (A) and endothelium-independent responses to SNP (B) in aortic rings from Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed on control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed on cocoa diet (ZDF-Co). Abscissa shows the agonist concentration (log mol/L). Ordinate shows the relaxation (as a percentage of initial maximum precontraction). Values are means \pm SEM. n = 4



3. Capítulo tercero - Efecto de los flavanoles del cacao sobre la salud intestinal y la microbiota intestinal en animales diabéticos.

3.1. Resumen de los estudios en animales de experimentación.

3.1.1. Artículo VIII.



El cacao posee efectos antidiabéticos, lo que hace que la ingesta de una dieta rica en cacao en las ratas diabéticas mejore su metabolismo glucídico mediante múltiples mecanismos. Muchas enfermedades se caracterizan por alteraciones en la composición de la microbiota, lo que indica que el microbioma está estrechamente involucrado en el desarrollo de numerosas patologías, incluida la T2D. En este sentido, el cacao es capaz de modificar la composición de la microbiota intestinal de los humanos y de las ratas en condiciones saludables. Por lo tanto, es probable que la interacción de los componentes del cacao con la microbiota pudiera de algún modo contribuir a los efectos antidiabéticos del cacao. Así pues, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el efecto modulador de la ingesta de cacao sobre la salud intestinal y sobre la microbiota intestinal en las ratas diabéticas ZDF.

Para ello, se han empleado ratas macho ZL que han sido alimentadas con la dieta control y ratas macho ZDF que han sido alimentadas con la dieta control (ZDF-C) o con la dieta enriquecida en cacao al 10% (ZDF-Co) desde la semana diez a la veinte de vida. En este estudio, se han evaluado parámetros fisiológicos y morfológicos del epitelio colónico, así como la composición de la microbiota intestinal y los niveles de los SCFAs y del lactato de las heces. Los resultados muestran que las ratas diabéticas alimentadas con cacao presentan en la mucosa intestinal un aumento de los niveles de las proteínas ZO-1 y mucina, así como un descenso de la expresión de las citoquinas proinflamatorias (el TNF- α , la IL-6 y el MCP-1).

Además, el cacao fue capaz de modular la composición de la microbiota intestinal de las ratas diabéticas hacia un perfil más saludable, similar al de las ratas no diabéticas. En concreto, la dieta rica en cacao fue capaz de aumentar

Resultados – Capítulo tercero

la abundancia relativa de las bacterias productoras de acetato (del género *Blautia*) y de evitar el aumento de la cantidad relativa de bacterias productoras de lactato (del género *Enterococcus* y *Lactobacillus*) en los animales diabéticos. En consecuencia, los niveles totales de los SCFAs (principalmente del acetato) aumentaron significativamente en las heces de las ratas diabéticas alimentadas con cacao. Finalmente, la modificación de la microbiota intestinal se asoció estrechamente con una mejora de los parámetros bioquímicos relacionados con la homeostasis glucídica, la integridad intestinal y la inflamación.

Estos resultados nos han permitido concluir que la alimentación de las ratas diabéticas con una dieta rica en cacao modifica la composición de la microbiota intestinal hacia un perfil microbiano más saludable, sugiriendo que estos cambios podrían estar en parte relacionados con la mejora de la homeostasis glucídica y de la salud intestinal.

La aportación del doctorando y primer firmante del presente artículo ha pasado por el apoyo en el cuidado y mantenimiento del modelo *in vivo*, así como por la obtención de las muestras fecales y por la realización de las distintas técnicas bioquímicas: el GTT y la cuantificación de parámetros fisiológicos con kits comerciales. Además, ha participado en el análisis, redacción y discusión de los resultados.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres

Cocoa diet modulates gut microbiota composition and improves intestinal health in Zucker diabetic rats

David Álvarez-Cilleros^a, Sonia Ramos^a, María Elvira López-Oliva^b, Fernando Escrivá^{c,d},
Carmen Álvarez^{c,d}, Elisa Fernández-Millán^{c,d,*}, María Ángeles Martín^{a,d,*}

^a Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain

^b Departamento de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^c Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^d CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), ISCIII, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Diabetes type 2
Cocoa flavanols
Gut microbiota
Gut barrier
Gut inflammation
Glucose homeostasis

ABSTRACT

Cocoa supplementation improves glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats via multiple mechanisms. Furthermore, cocoa rich-diets modify the intestinal microbiota composition both in humans and rats in healthy conditions. Accordingly, we hypothesized that cocoa could interact with the gut microbiota (GM) in ZDF rats, contributing to their antidiabetic effects. Therefore, here we investigate the effect of cocoa intake on gut health and GM in ZDF diabetic rats.

Male ZDF rats were fed with standard (ZDF-C) or 10% cocoa-rich diet (ZDF-Co) during 10 weeks. Zucker Lean animals (ZL) received the standard diet. Colon tissues were obtained to determine the barrier integrity and the inflammatory status of the intestine and faeces were analysed for microbial composition, short-chain fatty acids (SCFA) and lactate levels. We found that cocoa supplementation up-regulated the levels of the tight junction protein Zonula occludens-1 (ZO-1) and the mucin glycoprotein and reduced the expression of pro-inflammatory cytokines such as tumour necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the colon of ZDF diabetic animals. Additionally, cocoa modulated the microbial composition of the ZDF rats to values similar to those of the lean group. Importantly, cocoa treatment increased the relative abundance of acetate-producing bacteria such as *Blautia* and prevented the increase in the relative amount of lactate-producing bacteria (mainly *Enterococcus* and *Lactobacillus* genera) in ZDF diabetic animals. Accordingly, the total levels of SCFA (mainly acetate) increased significantly in the faeces of ZDF-Co diabetic rats. Finally, modified GM was closely associated with improved biochemical parameters related to glucose homeostasis and intestinal integrity and inflammation.

These findings demonstrate for the first time that cocoa intake modifies intestinal bacteria composition towards a healthier microbial profile in diabetic animals and suggest that these changes could be associated with the improved glucose homeostasis and gut health induced by cocoa in ZDF diabetic rats.

1. Introduction

Diabetes is a complex metabolic disorder characterized by hyperglycaemia resulting from defects in insulin secretion and insulin action (ADA, 2017). At present, prevalence of type 2 diabetes (T2D) is reaching epidemic proportions, becoming a serious threat to public

health worldwide mainly due to the associated complications (WHO, 2016). The growing prevalence of T2D is positively related to harmful lifestyles, in particular the reduced levels of physical activity and increasingly unhealthy eating habits, indicating that diet plays a crucial role in the onset and progression of T2D (WHO, 2016). More importantly, an increasing body of evidence suggests that certain dietary

Abbreviations: AUC, area under the curve; GM, gut microbiota; GTT, Glucose tolerance test; HOMA-IR, homeostasis model assessment of insulin resistance; IL-6, interleukin-6; MCP-1, monocyte chemoattractant protein 1; PCNA, anti-proliferating cell nuclear antigen; SCFA, short chain fatty acids; STZ, streptozotocin; T2D, type 2 diabetes; TNF- α , tumour necrosis factor- α ; ZDF, Zucker diabetic fatty; ZL, Zucker lean; ZO-1, Zonula occludens-1

* Corresponding authors at: Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain (E. Fernández-Millán). Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais 10, 28040 Madrid, Spain (M.Á. Martín).

E-mail addresses: elfernan@ucm.es (E. Fernández-Millán), amartina@ictan.csic.es (M.Á. Martín).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109058>

Received 5 September 2019; Received in revised form 28 December 2019; Accepted 31 January 2020

Available online 01 February 2020

0963-9969/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

compounds may attenuate the risk of T2D by their ability to modulate gut microbiota (GM) composition (Nie, Chen, Hu, Fan, & Nie, 2019).

The GM comprises a complex community of bacteria that colonizes the surface and the lumen of the gastrointestinal tract. Microbiota transform food components and produce a wide range of derived metabolite that impact host's physiology and health in many ways, from the maintenance of intestinal homeostasis to energy metabolism (Van Treuren & Dodd, 2020). Indeed, many disease states have been associated with alterations in microbiota composition and consequently on their functionality, indicating that GM could be involved in the development of numerous pathologies (Danneskiold-Samsøe et al., 2019). In particular, microbiota function has been identified as a relevant and potentially modifiable factor that contributes to the development of metabolic diseases, including T2D (Li, Watanabe, & Kimura, 2017). Therefore, interventions targeting GM are emerging as promising effective strategies for the prevention and management of T2D.

Polyphenols are a large group of phytochemical compounds that have attracted much interest due to their beneficial properties. Accumulating evidences suggest that dietary polyphenols may interact with GM (Nash et al., 2018; Tomás-Barberán & Espín, 2019). Bioavailability of dietary polyphenols in the digestive tract is highly variable. Aglycones, monomeric and dimeric structures can be absorbed in the small intestine. However, most of polymeric structures reach the colon intact where they are metabolized by GM producing small microbial derived metabolites which are absorbed more efficiently and therefore may contribute to the beneficial health effects of polyphenols (González-Sarrias, Espín, & Tomás-Barberán, 2017). In addition, these natural compounds modulate the composition and function of GM exhibiting prebiotic effects and antimicrobial action against pathogenic intestinal microbiota (Marchesi et al., 2016; Singh et al., 2019). In this way, polyphenols can influence the bacterial production of fermented or degraded metabolites (short chain fatty acids –SCFA–) which can modulate multiple physiological pathways in several tissues, affecting gut health, glycaemic control, lipids profile and insulin resistance (Morrison & Preston, 2016). Therefore, a more complete understanding of this bidirectional interaction between polyphenols and GM should help to explain the beneficial health effects of these natural compounds.

Cocoa is considered a rich source of dietary polyphenols, mainly flavanols such as epicatechin and procyanidins. Cocoa flavanols can exert antidiabetic effects via multiple mechanisms, including antioxidant and anti-inflammatory effects, as well as by increasing insulin secretion and insulin action (Martín, Goya, & Ramos, 2016). In addition, a cocoa rich diet has been described as able to modify the intestinal microbiota composition in healthy rats (Massot-Cladera et al., 2014; Massot-Cladera, Pérez-Berezo, Franch, Castell, & Pérez-Cano, 2012), pigs (Jang et al., 2016; Magistrelli et al., 2016) and humans (Tzounis et al., 2011). Therefore, it is probable that interaction of cocoa components with GM actively contributes to the antidiabetic effects of cocoa. However, to date, the influence of cocoa feeding on intestinal health and on the composition of GM in diabetes remains to be considered. Accordingly, the aim of the present study was to investigate whether cocoa supplementation modulate intestinal dysbiosis induced by diabetes in an *in vivo* model of T2D, using Zucker diabetic fatty (ZDF) rats. To this end, the effect of a cocoa rich-diet on glucose homeostasis and biomarkers of gut health in diabetic ZDF rats was evaluated. In addition, the compositional changes in GM and SCFAs induced by cocoa in diabetic animals were also determined.

2. Material and methods

2.1. Diets, animals and experimental design

Diets were prepared from an AIN-93G formulation (Panlab S.L., Barcelona, Spain). Cocoa rich-diet (10%) was produced by adding 100 g/Kg of natural Forastero cocoa powder (a kind gift from Idilia Foods, Barcelona, Spain) to AIN-93G diet. It contains epicatechin

Table 1

Composition of the experimental control and cocoa-rich diets.

Component (g/Kg dry weight)	Control	Cocoa
Casein	140	140
Dextrose	155	155
Sucrose	100	100
Fat	40	40
t-BHQ (<i>tert</i> -butylhydroquinone)	0.008	0.008
Mineral mix.	35	35
Vitamin mix.	10	10
L-Cys	1.8	1.8
Cholin bitartrate	2.5	2.5
Cellulose	100	66
Starch	415.7	349.7
Cocoa powder	–	100
Energy (kJ/kg diet)	15,048	15,048

(382 mg/100 g), catechin (115 mg/100 g) and procyanidins (167 mg/100 g) and non-flavonoid compounds such as theobromine (742 mg/100 g). The resulting cocoa diet was isoenergetic and its composition is given in Table 1.

Male Zucker diabetic fatty (ZDF) rats (n = 16) and their Zucker lean controls (ZL) (n = 6) were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) at 9 weeks of age. Animals were placed under standard controlled conditions (21 °C ± 1 °C; 12 h day/night cycle). After one week of acclimation, ZDF diabetic rats were randomly divided into two groups of eight animals that received the standard AIN-93G diet (ZDF-C) or the same control diet supplemented with 10% of cocoa (ZDF-Co) for 10 weeks. The lean Zucker rats (ZL) received the standard AIN-93G diet. During the experiment, food and water were available *ad libitum*. Food intake was monitored daily and animal weight and glycaemia was weekly followed. Animals were treated according to the European (2010/63/EU) and Spanish (RD 53/2013) legislation on Care and Use of Experimental Animals and the experiments were approved by the Ethics Committee from Comunidad de Madrid (PROEX 304/15).

2.2. Biochemical determinations

At 20 weeks of age, animals were fasted overnight and were scarified by exsanguination under anaesthesia ketamine/xylazine (80 mg/8 mg Kg⁻¹, i.p.). Blood samples were collected for biochemical analysis. Glucose was determined using an Accounted Glucose Analyzer (LifeScan España, Madrid, Spain) and insulin and glycosylated haemoglobin (HbA1c) were quantified by ELISA kits (Rat Insulin, Merckodia, Uppsala, Sweden; HbA1c Kit Spinreact, BioAnalítica, Madrid, Spain). Fasting plasma concentrations of both glucose and insulin were used to calculate indices of insulin resistance [homeostasis model assessment (HOMA)-IR] and secretion (HOMA-B) using the following formulae: HOMA-IR = fasting insulin (mU/ml) × fasting glucose (mM)/22.5; HOMA-B = 20 × fasting insulin (mU/ml)/[fasting glucose (mM) × 3.5]. Triacylglycerols (TG), HDL-Chol and LDL-Chol were determined in serum by kits (BioSystems, Madrid, Spain) as described elsewhere (Álvarez-Cilleros et al., 2019). Tumour necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) levels were quantified in serum samples by specific rat TNF-α Quantikine ELISA Kit (RTA00, R&D System, USA) and IL-6 DuoSet ELISA Kit (DY506, R&D System, USA) according to the manufacturer's instruction.

2.3. Glucose tolerance test (GTT)

GTTs were performed one week before the end of the study. Briefly, an overload of glucose (2 g/Kg body weight) (Sigma Chemical, Madrid, Spain) was ip administered in animals subjected to overnight fasting. Blood samples were collected from the tail vein at five different time points (0, 30, 60, 90, 120 and 180 min) and glucose levels were measured using an Accounted Glucose Analyzer (LifeScan España, Madrid,

Spain). The integrated glucose response (area under the curve, AUC) over a period of 180 min after glucose overload was also calculated.

2.4. Histologic and immuno-histochemical analysis

Rats were sacrificed at 20 weeks of age and the entire colon was resected and cleaned with PBS. Sections (2 cm) from the most distal portion of the colon were routinely processed and paraffin embedded for histological and immuno-histochemical analyses. Sections were cut, stained with haematoxylin-eosin (H&E) or periodic-acid-Schiff (PAS) according to the manufacturer's instructions. Images were obtained under light microscopy (Leica DM LB2) and a digital Leica DFC 320 camera (Leica, Madrid, Spain) and quantified with ImageJ software (Fiji image J; 1.52i, NIH, USA). The crypt depth was measured from H&E slices and was determined as number of cells per hemi-crypt. Only crypts with an open longitudinal crypt axis were analysed. The tissue expression level of the neutral mucin glycoprotein was determined by means of PAS and it was calculated as the number of PAS positive cells per crypt.

For the immuno-histochemical staining, antibodies against monoclonal anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA; PC-10) (Lab Vision Corporation and Bionova- Científica SL), Cyclin E (sc-247, Santa Cruz Biotechnology), p21 (sc-6246, Santa Cruz Biotechnology), Zonula occludens-1 (ZO-1) (sc-10804, Santa Cruz Biotechnology), tumour necrosis factor- α (TNF- α) (sc-133192, Santa Cruz Biotechnology), interleukin-6 (IL-6) (sc-57315, Santa Cruz Biotechnology), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (sc-52701, Santa Cruz Biotechnology) and CD45 (ab-10558, Abcam) were used. After deparaffinization and endogenous peroxidase quenching, serial colonic sections were incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C. Secondary antibodies were used to detect primary antibodies, followed by streptavidin-tagged horseradish peroxidase and visualized by 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate (Sigma Chemical, Madrid Spain). The sections were counterstained with Harris's haematoxylin, dehydrated and mounted. Brown colour indicates specific protein immunostaining and light blue colour indicates nuclear haematoxylin staining. Positive and negative controls were used during the optimization of the methods.

At least 20 perpendicular well-oriented crypts were examined in each animal under light microscopy at x400 magnification. The proliferative labelling index (LI) (%) was calculated as the number of positive nuclei \times 100/total number of cells per crypt column height. ZO-1, TNF- α , IL-6, MCP-1 and CD45 protein expression level was evaluated as percentage of the stained area to the total area per crypt by using the colour deconvolution plug-in from ImageJ v1.52j software.

2.5. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) assay

Apoptotic colonic epithelial cells were labelled *in situ* by identifying DNA fragmentation on paraffin embedded sections using the terminal deoxynucleotidyl transferase UTP nick end labelling (TUNEL) assay. After deparaffinization and rehydration tissue sections were permeabilized with proteinase K (20 μ g/mL) for 15 min at 37 °C, and then treated with 3% hydrogen peroxide for 5 min to quench endogenous peroxidase activity. After sections were incubated with equilibration buffer for 10 min, followed by immediate application of TdT-enzyme working for 1 h at 37 °C. Slices were incubated with peroxidase conjugated streptavidin and subsequent staining with DAB and counterstaining with methyl green. The apoptotic index represents the proportion of cells undergoing apoptosis within a crypt column (x400) and was calculated as the ratio of TUNEL-positive cells to the total number of cells counted within 50 full-length well orientated crypts.

2.6. Faecal samples

Fresh faecal samples were collected at the end of the intervention period, early in the morning, by abdominal massage in sterilized tubes and immediately frozen at -80 °C for future analyses.

2.7. DNA extraction, and 16S gene PCR amplification. Illumina Mi-Seq sequencing

DNA was extracted from faecal samples using G-spin columns (INTRON Biotechnology). DNA concentration was determined using Quant-IT PicoGreen reagent (ThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) and around 3 ng were used to amplify the V3-V4 region of 16S rRNA gene (Caporaso et al., 2011). PCR products (approx. 450 bp) included extension tails, which allowed sample barcoding and the addition of specific Illumina sequences in a second low-cycle number PCR. Individual amplicon libraries were analysed using a Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) and a pool of samples was made in equimolar amounts. The pool was further cleaned, quantified and the exact concentration estimated by real time PCR (Kapa Biosystems). Finally, DNA samples were sequenced on an Illumina MiSeq instrument with 2 \times 300 paired-end read sequencing at the Unidad de Genómica (Parque Científico de Madrid, Spain).

We used the BIPES pipeline to process the raw sequences (Zhou et al., 2011) and we performed UCHIME (implemented in USEARCH, version 6.1) to screen out and remove chimeras in the *de novo* mode (Edgar & Flyvbjerg, 2015). In each sample between 90,000 and 220,000 sequences were identified. All subsequent analyses were performed using 16S Metagenomics (Version: 1.0.1.0) from Illumina. The sequences were then clustered to an operational taxonomic unit (OTU) using USEARCH with default parameters (USERACH61). The threshold distance was set to 0.03. Hence, when the similarity between two 16S rRNA sequences was 97%, the sequences were classified as the same OTU. QIIME-based alignments of representative sequences were performed using PyNAST, and the Greengenes 13.8 database was used as the template file. The Ribosome Database project (RDP) algorithm was applied to classify the representative sequences into specific taxa using the default database (Edgar & Flyvbjerg, 2015). The Taxonomy Database (National Center for Biotechnology Information) was used for classification and nomenclature. Bacteria were classified based on the SCFA end-product as previously described (Wang, Garrity, Tiedje, & Cole, 2007).

2.8. Measure of SCFAs and lactate in faeces

Faecal samples were weighed and suspended in 1 mL of water with 0.5% phosphoric acid per 0.1 g of sample and frozen at -20 °C immediately after collection. Once thawed, the faecal suspensions were homogenized with a vortex for about 2 min and centrifuged for 10 min at 17,949g. Aliquots of 400 μ L of supernatants were diluted with 100 μ L of 4-methyl valeric acid used as internal standard at a final concentration of 788 μ M and then the suspension was extracted with 1 mL of n-butanol for 21 min and centrifuged for 105 min at 16,000g. A stock solution containing the mixture of standards (WSFA-2; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was treated as samples and diluted to obtain a calibration curve ranging from 2 to 10,000 μ M. Internal standard was also added to the mixture of standards.

The analytes (2 μ L) were injected in the splitless mode into an Agilent 7890A gas chromatography (GC) system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a 5975C mass spectrometer (MS) detector and an Agilent DB-WAXtr column (100% polyethilen glycol, 60 m, 0.325 mm, 0.250 μ m). Helium was used as a carrier gas at 1.5 mL/min. The column temperature was initially 50 °C, then increased to 150 °C at 15 °C/min, to 200 °C at 5 °C/min, and finally to 240 °C at 15 °C/min and kept at this temperature for 20 min (total time 41.3 min). The MS was tuned during all experiments; the signal

acquisition for quantification was done in the single-ion monitoring (SIM) mode. The temperature of the ionization source and the quadrupole were 230 °C and 150 °C, respectively. The electron-impact ionization energy was 70 eV. Concentrations of acetate, propionate and butyrate were expressed as µM/g of sample.

For lactate determination faecal samples were suspended in MilliQ water. After homogenization with an ultrasonic liquid processor Vibra-Cell CV18 (Sonics & Materials, Connecticut, United States), faecal suspensions were centrifuged at 1000g for 5 min. The aqueous phase was filtered through a 0.2 µm cellulose acetate syringe filter (VWR International, Barcelona, Spain). After filtration, lactate was measured with an Advanced Compact Ion Chromatographic instrument IC867 (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). Sodium L-lactate (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) was used as standard. Concentrations of lactate were expressed as µM/g of sample.

2.9. Statistical analysis

Data from biochemical and immune-histochemical parameters, relative abundances of taxa and SCFA levels were tested for normality and homogeneity of variances by the D'Agostino and Pearson and Levene tests, respectively; for multiple comparisons, one-way ANOVA was followed by a Tukey test when variances were homogeneous or by the Tamhane test when variances were not homogeneous. The level of significance was $P < 0.05$. A GraphPad Prism version 7.00 (GraphPad software, Inc., La Jolla, California) was used.

Shannon, Chao and Simpsons indexes were calculated to analyse α -diversity using QIIME. Reads in each OTU were normalized to total reads in each sample. Unsupervised classification studies with Principal Components Analysis (PCA) were carried out to analyse the differences between groups. Relationship strength between parameters was assessed using the two tailed Pearson's correlation test. The correlation was considered significant only when the absolute value of Pearson's correlation coefficient r was > 0.5 .

3. Results

3.1. Physiological parameters

At the beginning of the study, ZDF animals showed marked increases in body weight as compared to ZL rats (210.0 ± 9.0 vs 284.4 ± 10.6 g, respectively; $P < 0.05$). However, fasted glycaemia was not significantly different between ZL and ZDF animals (84.6 ± 6.0 vs 102.2 ± 13.1 mg/dL, respectively; $p < 0.05$), which indicates that at this time point animals were at a pre-diabetic stage. Then, ZDF rats were randomly assorted to ZDF-C or ZDF-Co groups. The administration of cocoa for 10 weeks reduced body weight in diabetic ZDF rats while daily food intake remained constant (Fig. 1A and 1B). Moreover, the increase in glycaemia, insulinaemia and HbA1c that is characteristic of ZDF rats was significantly reduced in those fed with cocoa diet (ZDF-Co) (Fig. 1C–E). Likewise, there was a significant reduction in insulin resistance state (HOMA-IR) and a significant increase in beta-cell function (HOMA-B) in ZDF-Co rats as compared to ZDF (Fig. 1F). Finally, the glucose tolerance test showed that diabetic ZDF-Co rats were less intolerant than ZDF-C rats and, consequently, their AUC value was significantly reduced by the cocoa rich diet (Fig. 1G). In contrast, HDL-Chol, LDL-Chol and TG levels were significantly elevated in both diabetic ZDF groups in comparison to the ZL group and cocoa diet only was able to partly reduce the levels of LDL-Chol in ZDF animals (Fig. 1H). Altogether, these results indicated that cocoa intake was able to improve glycemic control but not lipid profile in diabetic and obese ZDF rats.

3.2. Intestinal integrity and inflammation

Next, we investigated the effect of cocoa treatment in the intestinal

barrier integrity and colonic inflammation in diabetic rats. Morphological modifications at a scale larger than crypts were not observed. As shown in Fig. 2A, diabetic ZDF-C rats revealed a similar crypt depth to the ZL lean group whereas rats fed with cocoa presented a significantly larger crypt depth. Accordingly, colonocyte proliferation and apoptosis (Fig. 2B and C) were similar in diabetic and lean animals while both processes were significantly increased in ZDF-Co animals, indicating that cocoa intake induced a faster renewal rate of the colonic epithelium. To deepen the mechanism by which cocoa intake increases the colon mucosa and its renewal, we also evaluated the expression patterns of cell cycle proteins such as cyclin E, a late G1 phase cyclin and CDK p21 inhibitors as indicator of cell proliferation activity in colonic mucosa. ZDF-Co rats showed increases in the cytosolic and diffuse distribution of positive nuclei expression of cyclin E, compared to ZL and ZDF-C groups. The high levels of cyclins E induced by cocoa might be explained, at least in part, by a coordinate decrease in p21, reducing their association with cyclins and finally aiding the progression of cell cycle (Supplementary Fig. 1). Likewise, levels of the mucin glycoprotein, a crucial component of the mucus layer expressed in goblet cells, were also slightly but significantly increased in the diabetic animals fed with cocoa (Fig. 2D). In addition, control diabetic animals showed a significant decrease in the levels of one of the main tight junction proteins Zonula occludens-1 (ZO-1) in comparison with control lean group; interestingly, diabetic animals fed with cocoa not only prevented the ZO-1 decrease induced by diabetes but also showed ZO-1 levels significantly higher than those of the lean group (Fig. 2E). Finally, the expression of pro-inflammatory cytokines (TNF α , IL-6, and MCP-1) and the levels of CD45 (marker of immune cell infiltration) were significantly increased in the colonic mucosa of diabetic rats and they were partly prevented in those fed with cocoa (Fig. 3A–D). The circulating levels of the cytokines IL-6 and TNF- α in serum were not significantly different among ZL, ZDF-C and ZDF-Co rats (Fig. 3E). Overall, these results indicate that cocoa diet to a large degree greatly maintains the intestinal integrity and generally reduced intestinal inflammation in diabetic rats.

3.3. Bacterial diversity and taxa composition

To analyse the effect of diabetes on gut microbial composition and the influence of a cocoa rich diet, we performed a metagenomic DNA sequencing of bacterial 16S rRNA gene regions V3–V4 of faecal samples. The total number of species identified was higher in ZDF-C rats when compared with ZL or ZDF-Co rats (Fig. 4A). Likewise, Shannon, Simpsons and Chao indexes representing the richness and evenness of species diversity within each sample (α -diversity), were markedly augmented in control diabetic rats (Fig. 4B–D). We also performed a bi-dimensional PCA of the bacterial community, which measures micro-organism diversity between samples (β -diversity) in an unsupervised manner. The analysis revealed distinct clustering in each group (Fig. 4E).

Microbiota in diabetic animals (ZDF-C) were characterized by a significant increase in the relative abundance of *Proteobacteria* (3.6 fold increase), *Tenericutes* (2.8 fold increase) and *Actinobacteria* (2.6 fold increase) phyla and a reduction of *Verrucomicrobia* phylum (by 76.9%) when compared with ZL non-diabetic animals (Fig. 4F). Notably, with the exception of *Verrucomicrobia* phylum, the microbial changes induced by diabetes were totally prevented in animals that were fed with cocoa. In addition, cocoa significantly increased the relative percentages of *Firmicutes* (1.4 fold increase) and *Deferribacteres* phyla (9.3 fold increase) and decreased the relative abundance of *Cyanobacteres* phylum (by 74.9%) when compared to the ZDF group. Overall, colonic microbiota was dominated by the *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* and *Verrucomicrobia* phylum which accounted for over 96.8%, 96.7% and 95.8% of total bacteria in ZL, ZDF-C and ZDF-Co groups, respectively. Interestingly, the most important and recognized biomarker of dysbiosis, the *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) ratio, was

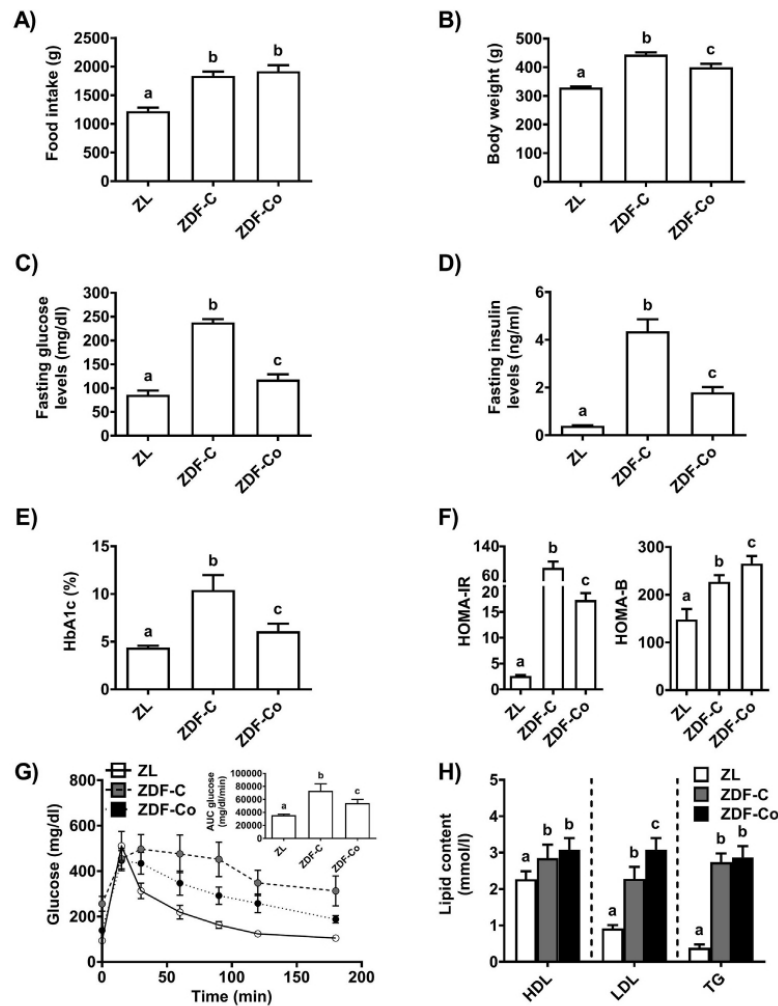


Fig. 1. Effect of cocoa diet in glucose and lipid homeostasis in Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). (A) Food intake. (B) Body weight. (C) Plasma glucose levels. (D) Plasma insulin levels. (E) Glycosylated haemoglobin (HbA1c). (F) Homeostasis model assessment (HOMA)-IR and HOMA-B. (G) Plasma glucose levels during GTT and total area under the curve calculated from the GTT data. (H) Levels of HDL, LDL and TG in serum. Data represent the means \pm SD of 6–8 animals. Means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P < 0.05$).

significantly increased in both ZDF-C and ZDF-Co rats (Fig. 4G).

At the family level, twenty families were identified with a relative abundance greater than 1% (Fig. 5A). Eleven of these families significantly modified their relative abundance with diabetes or cocoa (Fig. 5B). In particular, in ZDF-C diabetic animals, the relative abundance of *Enterobacteriaceae* (a family of the *Proteobacteria* phylum) and of *Enterococcaceae* and *Lactobacillaceae* (families of the *Firmicutes* phylum) increased whereas the abundance of *Ruminococcaceae* (of the *Firmicutes* phylum) and *Verrucomicrobiaceae* (of the *Verrucomicrobia* phylum) decreased. Interestingly, except for the *Verrucomicrobiaceae* family, cocoa diet significantly prevented all these microbial changes induced by diabetes. Moreover, cocoa supplementation increased the abundance of *Flavobacteriaceae*, *Prevotellaceae* and *Sphingobacteriaceae* (families from *Bacteroidetes* phylum) and *Lachnospiraceae* (*Firmicutes* phylum) in diabetic animals.

Fig. 6 shows the changes found at genus and species level. Twenty

one genera were identified with abundance greater than one per cent and eleven of these were significantly modified by either diabetes or the cocoa diet. The major differences found in diabetic ZDF-C animals were observed in the genera *Escherichia* (mainly *E. alberti* species), *Tepidibacter*, *Lactobacillus* (with *L. antri*, *L. hayakitsensis* and *L. johnsonii* as the most prevalent species) and *Enterococcus* (mainly *E. lactis* species) that were significantly higher compared with non-diabetic ZL. Conversely, *Faecalibacterium* and *Oscillospira* genera were significantly lower in the ZDF-C group. Once again, cocoa diet was able to prevent all these intestinal microbiota changes in diabetic animals. However, both ZDF-C and ZDF-Co showed significantly decreased levels of *Akkermansia* genus when compared with ZL group, a finding that was also noticeable at the species levels (*A. muciniphila*). Finally, cocoa treatment induced *Blautia* (mainly *B. hansenii* and *B. wexleare* species) and *Flavobacterium* and reduced *Parabacteroides* (mainly *P. goldsteinii* and *P. distasonis*) and *Sutterella* genera in diabetic animals.

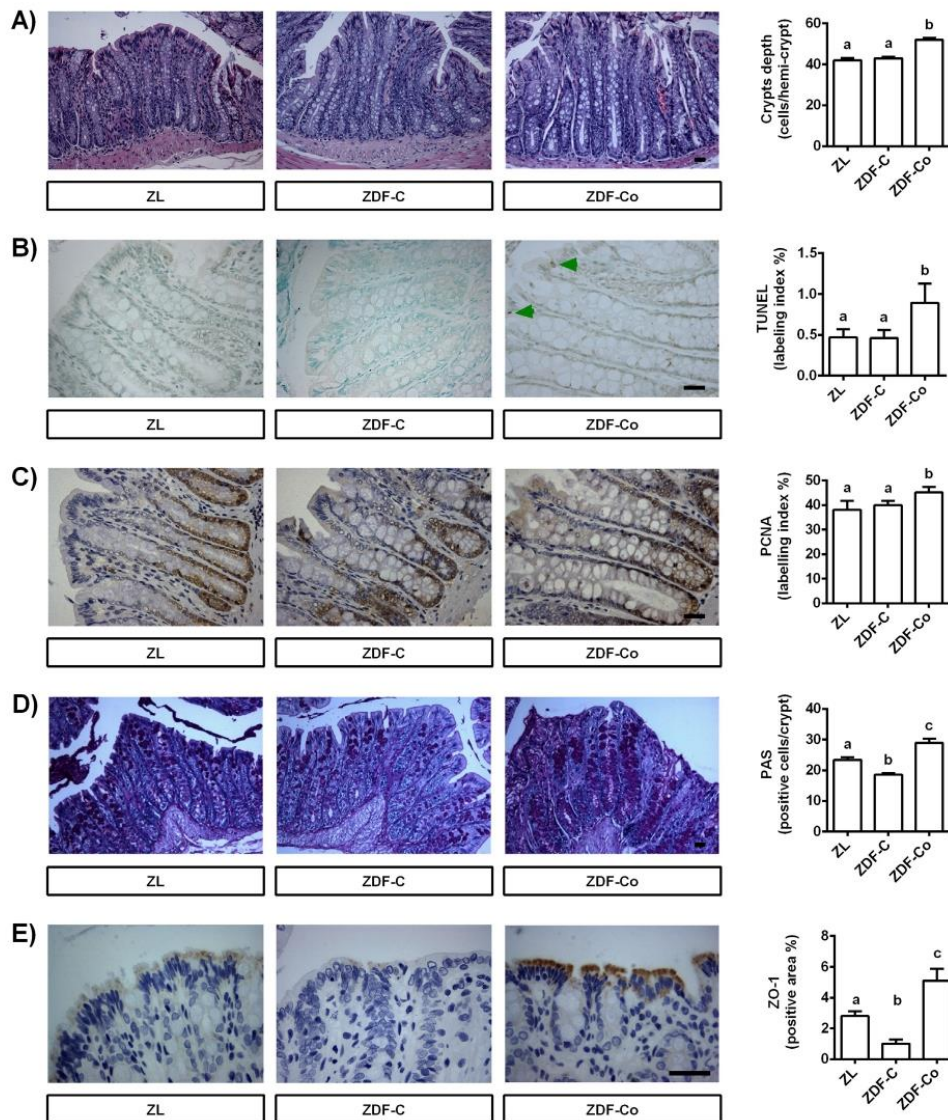


Fig. 2. Effects of cocoa diet on colon mucosa of Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). (A) Representative haematoxylin–eosin (H&E) stained sections and crypts depth measured as cells number per hemicrypt of the distal colon mucosa (scale bar 10 μ m). (B) Colonic epithelial apoptosis as revealed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labelling (TUNEL) assay (brown-positive nuclei) (scale bar 10 μ m) and quantification of apoptotic cells by TUNEL labelling index (%). (C) Representative photographs for immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (brown-positive nuclei) (scale bar 10 μ m) and PCNA labelling index (%) in colonic mucosa. (D) Representative images of mucine glycoprotein by PAS staining (magenta) and quantitative analysis of positive PAS staining cells (%) (scale bar 10 μ m). (E) Representative IHC photographs of ZO-1 protein expression and the positive area staining (%) (brown-stained) (scale bar 10 μ m). Means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P < 0.05$).

3.4. SCFA- and lactate-producing bacteria and levels of lactate and SCFA in faeces

Next, we analysed the changes in the relative abundance of lactate- and SCFA-producing bacteria (Fig. 7A and C–F) as well as the lactate and SCFA levels in faeces (Fig. 7B). The relative abundance of butyrate-producing bacteria was essentially unchanged in all groups (Fig. 7A). However, we found that cocoa feeding significantly increased the

relative abundance of acetate-producing bacteria (mainly due to an induction in *Blautia* genus) (Fig. 7C) that was accompanied by higher levels of acetate in faeces (Fig. 7B). On the other hand, diabetic animals showed a significant increase in the amount of lactate-producing bacteria that was driven primarily by changes in *Enterococcus* and *Lactobacillus* genera (Fig. 7E) and a significant reduction in the relative amount of propionate-producing bacteria that was reproduced for *Akkermansia* genus (Fig. 7F). Accordingly, the levels of lactate were

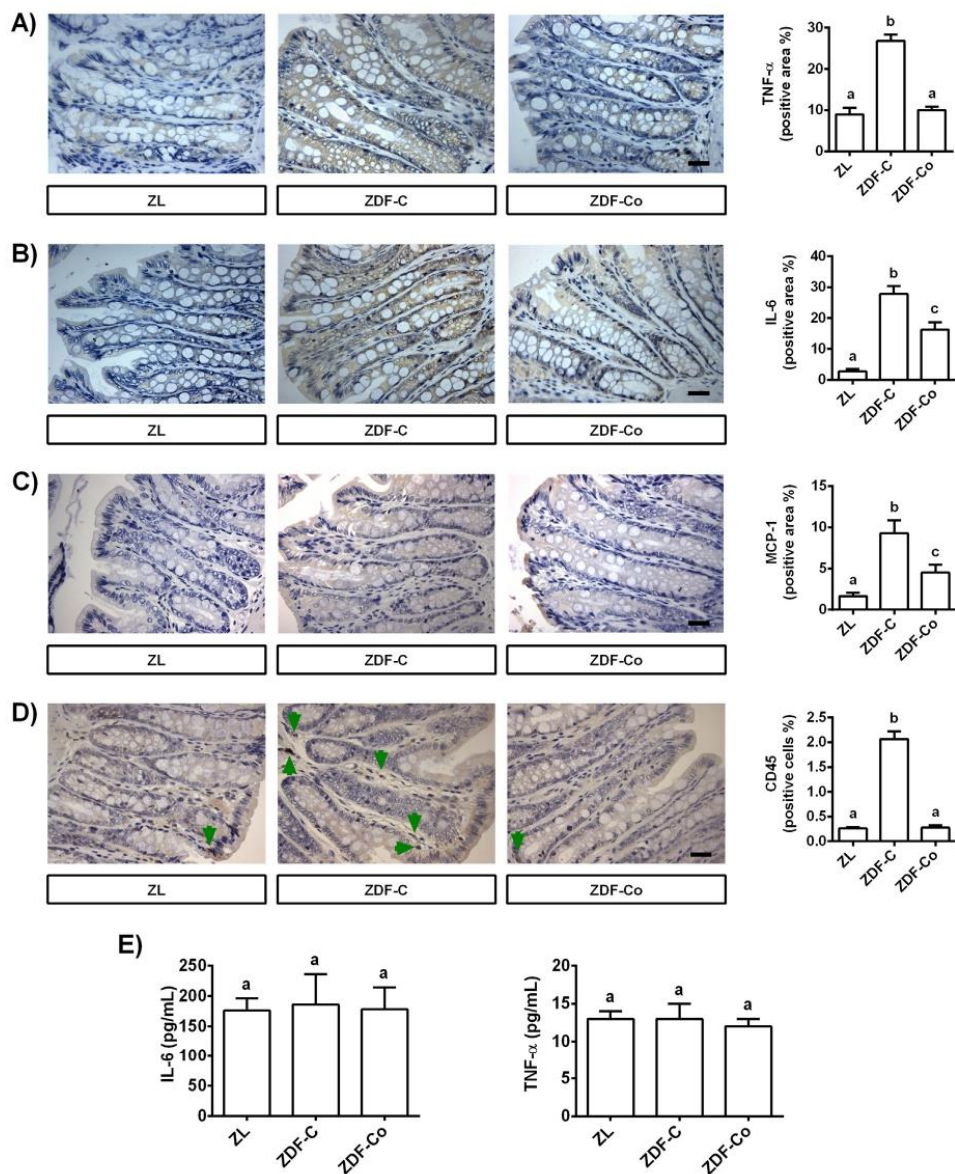


Fig. 3. Effects of cocoa diet on intestinal inflammation of Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). Representative immunohistochemistry photomicrograph of TNF-α (A), IL-6 (B), MCP-1 (C) and CD45 (D) (brown-stained) in distal colon and immunoreactive score (scale bar 10 μm). Levels of TNF-α and IL-6 in plasma (E). Values are expressed as mean ± SD (n = 6–8). Means sharing the same letter are not significantly different from each other (P < 0.05).

significantly higher in the faeces of diabetic animals while the levels of propionate were significantly lower. Notably, cocoa treatment partly prevented the increase in lactate-producing bacteria and as a result the levels of lactate were lower than those found in diabetic animals.

3.5. Correlation of gut microbiota and disease biomarkers

Finally, to further explore the relationship between the significantly

altered genera in the microbiota of diabetic animals and clinical parameters related to glucose and lipid metabolism as well as intestinal integrity and inflammation, we performed a Person correlation analysis (Fig. 8). A strong positive association was found between the relative abundance of *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus* and *Tepidibacter* genera and the increase in body weight and in several biomarkers of glucose homeostasis and inflammation. However, the genera *Oscillospira* and *Akkermansia* showed significantly negative correlations with

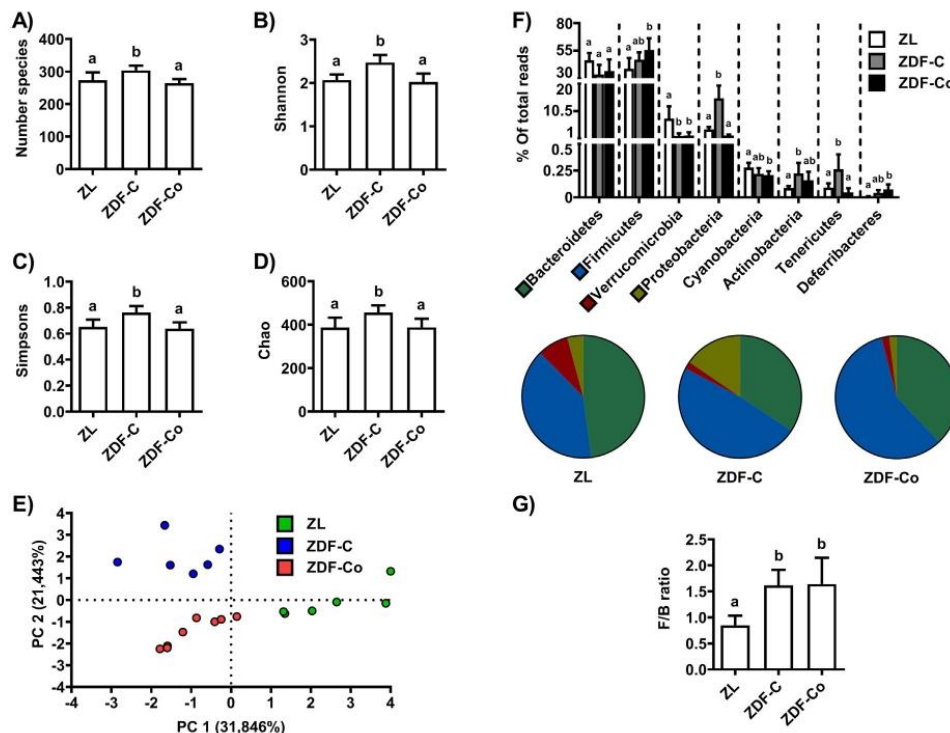


Fig. 4. Bacterial diversity and taxa composition in Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). (A) Number of species identified. (B) Shannon, (C) Simpson's and (D) Chao indexes were measured to evaluate the α -diversity. (E) Unsupervised PCA were carried out to analyse the β -diversity. Each principal component describes most of the variation between samples. (F) Composition of the most abundant bacterial phyla (> 0.1%) expressed as a percent of total bacteria and pie graphs of most abundant phyla. (G) Firmicutes to Bacteroidetes ratio (F/B). Data represent means \pm SD of 6–8 animals per condition. Means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P < 0.05$).

all these parameters. Likewise, *Fecalibacterium* showed significantly negative correlations with increase in body weight, insulinaemia, HbA1c, LDL, TG, IL-6, CD45 and MCP-1. Finally, the presence of *Flavobacterium* was also negatively associated with, glycaemia, TNF- α and CD45. On the other hand, increased ZO-1 levels were positively associated with *Blautia* and *Flavobacterium* and negatively linked with *Enterococcus*, *Escherichia*, *Parabacteroides*, *Sutterella* and *Tepidibacter*.

4. Discussion

In the present study, we show for the first time that cocoa intake modifies the intestinal bacteria composition in ZDF diabetic animals towards a healthier microbial profile. Interestingly, some of the gut microbiota modifications induced by cocoa are closely associated with improved glucose homeostasis and gut health, suggesting that the beneficial effects of cocoa in diabetes could be mediated, at least in part, by modulation of the microbiota.

Early reports have revealed the potential anti-diabetic properties of cocoa both *in vivo* and *in vitro* (Martin et al., 2016). In agreement with this, here we show that cocoa supplementation partially alleviated glucose and lipid control. More importantly, in this study we found that dietary cocoa was able to improve the structure and the barrier integrity of the colon mucosa in diabetic rats. The expression of the intestinal tight junction protein ZO-1 and the intestinal mucus levels are extremely important in maintaining intestinal barrier function (Andrade et al., 2015; Dhar & McAuley, 2019). Accordingly, in the present study, ZO-1 and mucin levels were significantly reduced in the

colon of control ZDF rats. However, diabetic animals fed on cocoa showed significantly higher expression of mucin and ZO-1 than those of the lean group. These results suggest that cocoa diet may improve the barrier function and integrity of diabetic animals through enhancing the protein expressions of mucin and ZO-1. Supporting this it has been shown that the intake of *Sabia miltiorrhiza*, a natural source of phenolic acids, ameliorates the damaged barrier function of diabetic mice through enhancing the expressions of tight junction proteins decreased by streptozotocin (STZ) (Gu et al., 2017). Likewise, it has been proved that long term intake of anthocyanins promoted intestinal integrity in healthy mouse (Peng et al., 2019). Notably, the tight junction of intestinal mucosal cells prevents excessive entrance of endotoxins and other noxious agents into the circulation system and therefore attenuates the activation of local and systemic inflammatory responses (Balakumar et al., 2018). Accordingly, diabetic animals showed a significantly increase in inflammatory cytokines such as IL-6, TNF α and MCP-1 as well as in the levels of CD45 (marker of immune cell infiltration) in the colonic mucosa that were significantly reduced by cocoa intake. Although the levels of LPS could not be assayed in the plasma of these animals, it could be highlighted that no significant differences in the levels of IL-6 and TNF α were found in plasma, which is consistent with previous data in ZDF rats at this age and fed on standard diet (Morales-Cano et al., 2019). Therefore, it could be suggested that the altered intestinal barrier function we described in ZDF rats is not sufficiently damaged to cause an overt metabolic endotoxemia. Overall, here we show that cocoa intake has the potential to improve gut barrier integrity in diabetic animals and to reduce colon

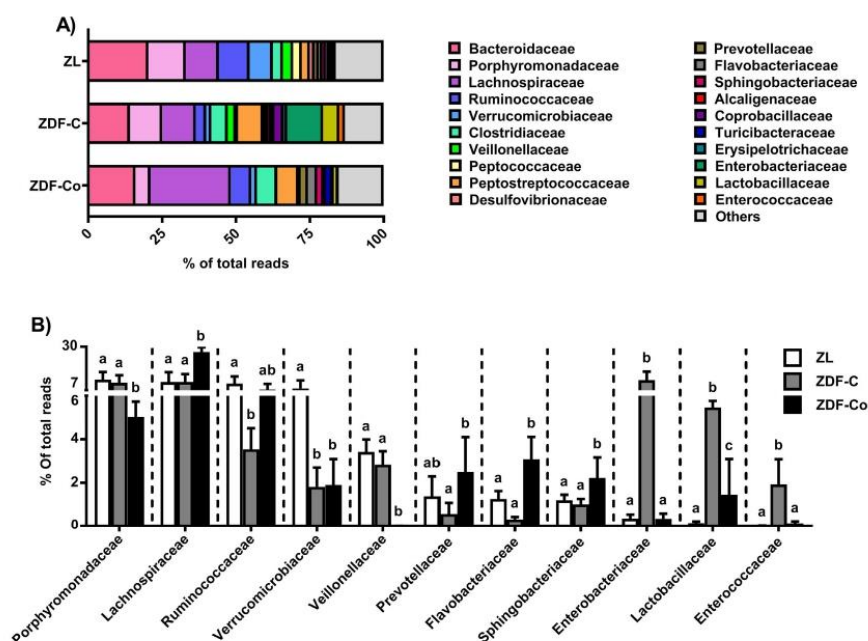


Fig. 5. Bacterial families composition in Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). (A) Distribution bar-plot of families with relative abundance greater than 1%. (B) Composition of the most abundant families modified with diabetes or with cocoa expressed as a percent of total bacteria. Data represent means \pm SD of 6–8 animals per condition. Means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P < 0.05$).

inflammation emerging as an additional tool to ameliorate diabetes. Although the precise molecular mechanism behind this protective effect is still unclear, we hypothesize that it could be related in part to the potential changes induced by cocoa in intestinal bacteria of diabetic animals due to its prebiotic activity (Singh et al., 2019).

Metabolic disorders such as diabetes have been associated with altered microbiota composition (Li et al., 2017). In this study, the composition of the GM in diabetic rats (ZDF-C) was significantly different compared with lean animals (ZL). At the phylum level, the main changes observed in diabetic animals were an increase in *Proteobacteria* and a decrease in *Verrucomicrobia* phyla whereas no significant differences were found in the relative abundance of *Firmicutes* and *Bacteroidetes*. Interestingly, microbiota in diabetic animals treated with cocoa differed between the diabetic control and the lean groups, suggesting that cocoa may have specific effects on the microbial community of diabetic animals. The reduction in *Proteobacteria* abundance in the ZDF-Co group can be attributed to the potential of cocoa polyphenols to modulate intestinal microbiota. These results are in concordance with those reported by Araújo et al. (2019), who observed a decrease in the abundance of the phyla *Proteobacteria* in the faeces of obese rats fed with an ethanolic extract of bacupari rich in phenol derivatives. However, cocoa supplementation failed to correct the increase in the *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) ratio that is characteristic of murine genetic obese models (Vallianou, Stratigou, Christodoulatos, & Dalamaga, 2019). It has been recently suggested that the regulation of microbiota by polyphenols could be independent of the decrease in the F/B ratio (Yang et al., 2019). More importantly, a systematic review has revealed that this relationship between F/B ratio and obesity is not always consistent, suggesting changes in specific microbiota as main responsible for metabolic outcomes (Sze & Schloss, 2016). According to that, we found that cocoa intake modified some key bacterial groups which may be related to the beneficial improvement on the glucose

homeostasis and gut health induced in diabetic animals.

The relative abundance of *Proteobacteria* in diabetic ZDF-C animals was partly ascribed to a significant increase in bacteria that belong to *Escherichia* genus (*Enterobacteriaceae* family) that are widely known to cause intestinal pathologies in humans and animals (Allen-Vercos & Jobin, 2014; Shin, Whon, & Bae, 2015). Likewise, although the absolute abundance of the *Firmicutes* phylum was unchanged in diabetic rats, certain genera were significantly modified when compared with the control lean group. Particularly, *Enterococcus* and *Lactobacillus* genera were increased in diabetic animals whereas *Oscillospira* genus was decreased. *Enterococcus* is a bacterial group which includes potential pathogens that have been associated with gut dysfunction and inflammatory diseases (Lo Presti et al., 2019). In contrast, *Lactobacillus* is classically considered a beneficial group of bacteria for their favourable effects on host metabolism; however, recent studies have indicated that the increase of this genus might be related to obesity and inflammatory conditions (Ge et al., 2018; Zeng et al., 2013), which is in concordance with our findings in diabetic animals. Similarly, *Oscillospira* genus is associated with anti-inflammatory effects in the gut and it has been reported to be less abundant in T2D and obese patients (Del Chierico et al., 2017; Liu et al., 2018). Interestingly, cocoa diet strongly prevented all these harmful changes observed in the gut microbiota of diabetic animals. These findings are in agreement with previous studies showing that quercetin and resveratrol attenuate serum inflammatory cytokines and improve glucose metabolism in high-fat diet-fed rats by modulating bacterial species associated with diseases and inflammation (Zhao et al., 2017). In the same way, modifications induced by cocoa intake on the GM of diabetic animals may play a key role in the beneficial effects on glucose metabolism and gut health.

It is interesting to note that the abundance of *Akkermansia* genus (phylum *Verrucomicrobia*) is low during obesity and diabetes (Vallianou et al., 2019). In addition, it has been demonstrated that polyphenol

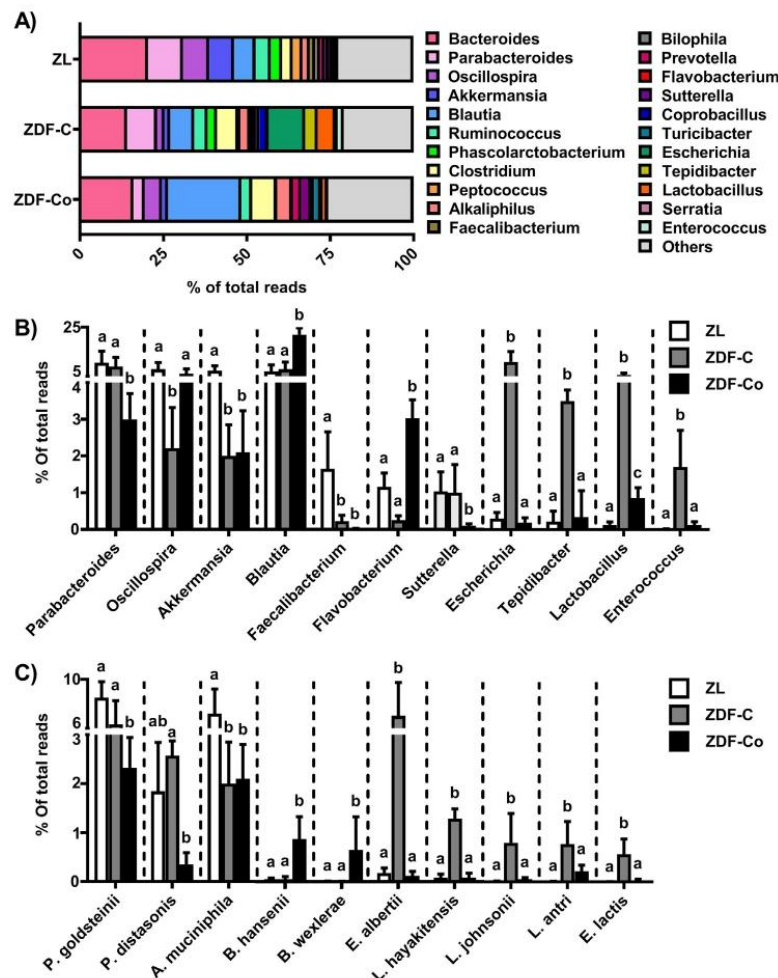


Fig. 6. Genus and species composition in Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). (A) Distribution bar-plot of genera with relative abundance greater than 1%. (B) Composition of the most abundant bacterial genera modified with diabetes or with cocoa expressed as a percent of total bacteria. (C) Composition of the most abundant bacterial species modified with diabetes or with cocoa expressed as a percent of total bacteria. Data represent means \pm SD of 6–8 animals per condition. Means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P < 0.05$).

treatment induces the expression of *A. muciniphila* which correlated with improved body weight and glucose tolerance (Anhê et al., 2016). However, we found that cocoa supplementation failed to restore the reduced abundance of *A. muciniphila* in diabetic animals even though glucose metabolism and gut health were significantly improved. Similar results have been reported in obese mice treated with resveratrol (Sung et al., 2017) or with polyphenol-containing extracts from cinnamon bark and grape pomace (Van Hul et al., 2018) showing improved glucose tolerance with reduced abundance of *Akkermansia*. As suggested by the authors (Van Hul et al., 2018), it is possible that polyphenols have varied prebiotic potential for *A. muciniphila*. In addition, several study design differences (origin of polyphenols, type of diet, animal model, age or pathological status) may also contribute to explain the divergence in results regarding the gut microbiota composition. Thus, further studies are required to explore the role of this bacterial group in type 2 diabetes.

Microbiota modulate the production of SCFA (mainly acetate,

butyrate and propionate) which can modify the concentrations of several gut peptides involved in glucose metabolism, gut barrier function and energy homeostasis (Parada Venegas et al., 2019). Accordingly, cocoa as a prebiotic food can positively affect the growth of beneficial bacterial species (Singh et al., 2019). In particular, it has been shown that a cocoa rich-diet promotes the growth of butyrogenic-type bacteria such as *Roseburia* in pigs (Solano-Aguilar et al., 2018). However, we found that the levels of butyrate-producing bacteria were essentially unchanged among all experimental groups while the abundance of acetate producing bacteria was significantly increased in cocoa fed rats. In addition, cocoa feeding increased the relative abundance of *Blautia*, a bacterial group that has been negatively correlated with obesity and T2D (Inoue et al., 2017; Rondanelli et al., 2015). This different prebiotic effect could be attributed to significant modifications in the gut environment during the diabetic milieu which lead to the dissimilar composition and distribution of the intestinal microbiota in healthy compared to diabetic animals.

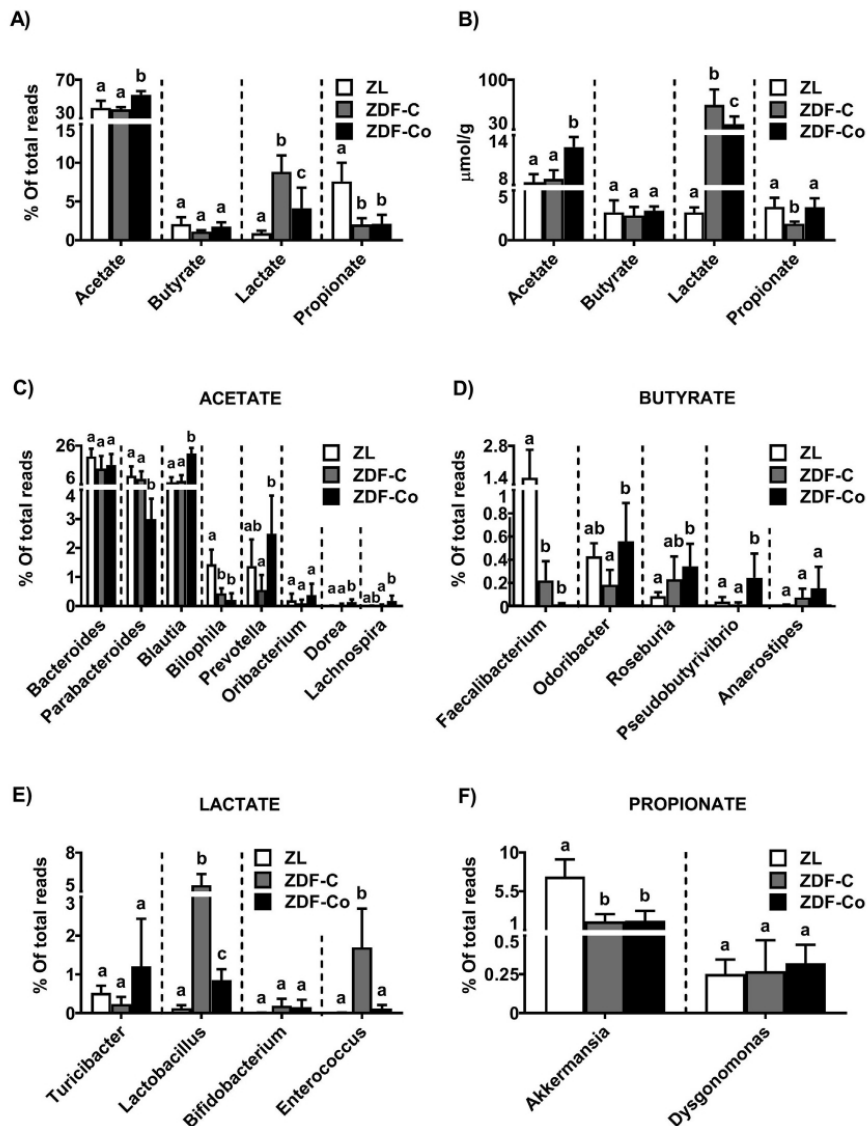


Fig. 7. SCFA- and lactate-producing bacteria and SCFA and lactate faeces levels in Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). (A) Sum of all SCFA- and lactate-producing genera expressed as a percent of total bacteria. (B) Acetate, butyrate, propionate and lactate levels in faeces. (C–F) Most abundant acetate-, butyrate-, propionate- and lactate-producing genera expressed as a percent of total bacteria. Data represent means \pm SD of 6–8 animals per condition. Means sharing the same letter are not significantly different from each other ($P < 0.05$).

Acetate can improve gut barrier function either by stimulating goblet cell differentiation or by the reinforcement tight junctions of epithelial cells (Morrison & Preston, 2016). In this regard, it has been recently shown, in an animal model of intestinal inflammation that the supplementation with polyphenols from grape peel significantly increased the production of SCFA (mainly acetate and butyrate) and the colonic protein levels of ZO-1 (Maurer et al., 2019). Similarly, in this study, the relative abundance of *Blautia* was directly associated with increased levels of ZO-1 and mucin. Moreover, cocoa diet also decreased the abundance of lactate producing bacteria (mainly

Lactobacillus and *Enterococcus*) and thus the level of lactate (precursor of SCFAs) in faeces. Interestingly, correlation analysis showed that both genera were positively associated with body weight and biochemical parameters related to glucose homeostasis and intestinal integrity and inflammation. Increased lactate levels have been observed in both humans and animal models of T2D and obesity and have been also associated with inflammation (Nishitsuji et al., 2017; Wu et al., 2016). However, microbial produced lactate is generally converted into propionate or butyrate by a subset of lactate-utilizing bacteria and it is unclear whether bacterial derived lactate contributes to the high levels

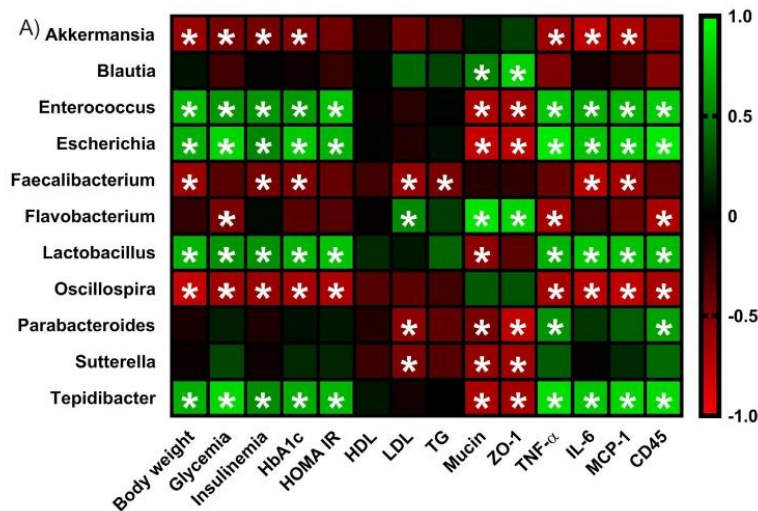


Fig. 8. Correlation analysis between gut microbiota and host parameters in diabetic rats. (A) Heatmap of correlation between the main significantly altered genera in the gut microbiota and host parameters related to diabetes and intestinal integrity and inflammation. Pearson correlation values were used for the matrix. The intensity of the colour represents the degree of association. *Denotes adjusted $P < 0.05$.

of plasma lactate in diabetics. Additionally, it should be taken into account that gut microbiota produces many other classes of metabolites such as SCFAs, bile acids and amino acid derivatives that may also have essential signaling functions (Van Treuren & Dodd, 2020). Altogether, here we show that cocoa could modulate GM and SCFAs production, contributing to the recovery of colon barrier function, attenuating inflammation and eventually improving glucose metabolism. Therefore, these results suggest that the modulation of GM might be one of the mechanisms involved in the antidiabetic effects of cocoa. Although we do not know whether the changes observed in fecal SCFAs concentration in both ZDF and ZDF-Co reflect similar variations in circulating SCFAs, it is reasonable to hypothesize that potential changes in systemic SCFAs levels could also contribute to the observed phenotypes of the animals.

One limitation of this study is the different levels of starch and fibre between control and cocoa diet. However, it has been shown that the intake of polyphenols improve the health effects of the intestinal microbiota by activating SCFA excretion, intestinal immune function, and other physiological processes (Kawabata, Yoshioka, & Terao, 2019). Therefore, after cocoa intake, the increase in SCFAs is not only due to its fibre content but also to other bioactive compounds mainly polyphenols and theobromine (Martín-Peláez et al., 2017). Further studies will clarify if the effect of cocoa on intestinal microbial populations can be ascribed to cocoa polyphenols and/or theobromine, to dietary fibre or to a possible synergistic activity of all of these dietary components.

In summary, the present study demonstrates for the first time that cocoa supplementation improves intestinal integrity and inflammation in ZDF diabetic rats. Moreover, cocoa intake modifies gut microbiome in ZDF diabetic rats towards a healthier profile and these changes have been closely associated with the improved glucose homeostasis and gut health found in the diabetic animals. Consequently, we suggest that modulation of GM by cocoa may be an important mechanism that could partly mediate beneficial metabolic effects in diabetic animals. Future studies using faecal transplantation from cocoa fed donors could help to address whether or not the alterations in the gut microbiota found in ZDF-Co rats play a pivotal role in mediating the beneficial metabolic effects of cocoa. Likewise, the application of metabolomics to microbiota could provide a more complex analysis to finally advance in the knowledge of the ultimate causality.

CRediT authorship contribution statement

David Álvarez-Cilleros: Investigation, Data curation, Visualization, Formal analysis. Sonia Ramos: Methodology, Investigation, Supervision, Writing - review & editing, Funding acquisition. María Elvira López-Oliva: Investigation, Data curation, Visualization, Formal analysis. Fernando Escrivá: Resources, Validation. Carmen Álvarez: Resources, Validation. Elisa Fernández-Millán: Conceptualization, Methodology, Writing - review & editing. María Ángeles Martín: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Writing - review & editing, Funding acquisition.

Acknowledgements

We are grateful to the Analysis Service Unit facilities of ICTAN for the analysis of Chromatography and Mass Spectrometry.

Funding

This work was supported by grants AGL2015-67087-R, BFU2016-77931-R and RTI2018-095059-B-I00 (MINECO/FEDER, UE) from the Spanish Ministry of Science and Innovation (MINECO). D. Álvarez-Cilleros is a FPI fellow from the predoctoral program of MINECO (BES-2016-076721).

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109058>.

References

- Allen-Vercor, E., & Jobin, C. (2014). Fusobacterium and Enterobacteriaceae: Important players for CRC? *Immunology Letters*, 162, 54–61. <https://doi.org/10.1016/j.imllet.2014.05.014>.
- Álvarez-Cilleros, D., López-Oliva, M. E., Morales-Cano, D., Barreira, B., Pérez-Vizcaino, F., Goya, L., ... Martín, M. A. (2019). Dietary cocoa prevents aortic remodeling and vascular oxidative stress in diabetic rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 30, e1900044. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900044>.

- American Diabetes Association (2017). Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care*, 40, S11–S44. <https://doi.org/10.2337/dcl7-S005>.
- Andrade, M. E. R., Araújo, R. S., de Barros, P. A. V., Soares, A. D. N., Abrantes, F. A., Generoso, S. D. V., & Cardoso, V. N. (2015). The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clinical Nutrition*, 34, 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2015.01.012>.
- Anhê, F. F., Pilon, G., Roy, D., Desjardins, Y., Levy, E., & Marette, A. (2016). Triggering Akkermansia with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? *Gut Microbes*, 7, 146–153. <https://doi.org/10.1080/19490976.2016.1194097>.
- Araújo, F. O., Moreira, M. E. C., Lima, C. F., Toledo, R. C. L., de Sousa, A. R., Veloso, M. P., ... Martino, H. S. D. (2019). Bacupari (Garcinia brasiliensis) extract modulates intestinal microbiota and reduces oxidative stress and inflammation in obese rats. *Food Research International*, 122, 199–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.012>.
- Balakumar, M., Prabhu, D., Sathishkumar, C., Prabhu, P., Rokana, N., Kumar, R., ... Balasubramanyam, M. (2018). Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *European Journal of Nutrition*, 57, 279–295. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1317-7>.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 4516–4522. <https://doi.org/10.1073/pnas.100080107>.
- Dannesiold-Samsøe, N. B., Dias de Freitas, H., Barros, Q., Santos, R., Bicas, J. L., ... Cazarin, C. B. (2019). Maróstica Jr., M.R. Interplay between food and gut microbiota in health and disease. *Food Research International*, 115, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.043>.
- Dhar, P., & McAuley, J. (2019). The role of the cell surface mucin MUC1 as a barrier to infection and regulator of inflammation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 117. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00117>.
- Del Chierico, F., Nobili, V., Vernocchi, P., Russo, A., De Stefanis, C., Gnani, D., ... Putignani, L. (2017). Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology*, 65, 451–464. <https://doi.org/10.1002/hep.28572>.
- Edgar, R. C., & Flyvbjerg, H. (2015). Error filtering, pair assembly and error correction for next generation sequencing reads. *Bioinformatics*, 31, 3476–3482. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt401>.
- Ge, Y., Liu, W., Tao, H., Zhang, Y., Liu, L., Liu, Z., ... Xu, T. (2018). Effect of industrial trans-fatty acids-enriched diet on gut microbiota of C57BL/6 mice. *European Journal of Nutrition*. <https://doi.org/10.1007/s00394-018-1810-2>.
- González-Sarrias, A., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2017). Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical scavenging effects. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 281–288. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.07.010>.
- Gu, J. F., Su, S. L., Guo, J. M., Zhu, Y., Zhao, M., & Duan, J. A. (2017). The aerial parts of Salvia miltiorrhiza Bge. strengthen intestinal barrier and modulate gut microbiota imbalance in streptozotocin-induced diabetic mice. *Journal of Functional Foods*, 36, 362–374. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.010>.
- Inoue, R., Ohuekitano, R., Tsukahara, T., Tanaka, M., Masuda, S., Inoue, T., ... Satoh-Asahara, N. (2017). Prediction of functional profiles of gut microbiota from 16S rRNA metagenomic data provides a more robust evaluation of gut dysbiosis occurring in Japanese type 2 diabetic patients. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 61, 217–221. <https://doi.org/10.3164/jcbl.17-44>.
- Jang, S., Sun, J., Chen, P., Lakshman, S., Molokin, A., Hamly, J. M., ... Solano-Aguilar, G. (2016). Flavanol-enriched cocoa powder alters the intestinal microbiota, tissue and fluid metabolite profiles, and intestinal gene expression in pigs. *Journal of Nutrition*, 146, 673–680. <https://doi.org/10.3945/jn.115.22968>.
- Kawabata, K., Yoshioka, Y., & Terao, J. (2019). Role of intestinal microbiota in the bioavailability and physiological functions of dietary polyphenols. *Molecules*, 24, 370. <https://doi.org/10.3390/molecules24020370>.
- Li, X., Watanabe, K., & Kimura, I. (2017). Gut microbiota dysbiosis drives and implies novel therapeutic strategies for diabetes mellitus and related metabolic diseases. *Frontiers in Immunology*, 8, 1882. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01882>.
- Liu, G., Bei, J., Liang, L., Yu, G., Li, L., & Li, Q. (2018). Stachyose improves inflammation through modulating gut microbiota of high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62, e1700954. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700954>.
- Lo Presti, A., Zorzi, F., Del Chierico, F., Altomare, A., Cocca, S., Avola, A., ... Guarino, M. P. L. (2019). Fecal and mucosal microbiota profiling in irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1655. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01655>.
- Magistrelli, D., Zanchi, R., Malagutti, L., Galassi, G., Canzi, E., & Rosi, F. (2016). Effects of cocoa husk feeding on the composition of swine intestinal microbiota. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 16, 2046–2052. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05732>.
- Marchesi, J. R., Adams, D. H., Fava, F., Hermes, G. D., Hirschfield, G. M., Hold, G., ... Hart, A. (2016). The gut microbiota and host health: A new clinical frontier. *Gut*, 65, 330–339. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309990>.
- Martin, M. A., Goya, L., & Ramos, S. (2016). Antidiabetic actions of cocoa flavanols. *Molecular Nutrition and Food Research*, 60, 1756–1769. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500961>.
- Martín-Peláez, S., Camps-Bossacoma, M., Massot-Cladera, M., Rigo-Adrover, M., Franch, A., Pérez-Cano, F. J., & Castell, M. (2017). Effect of cocoa's theobromine on intestinal microbiota of rats. *Molecular Nutrition and Food Research*, 61, 10. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700238>.
- Massot-Cladera, M., Pérez-Berezo, T., Franch, A., Castell, M., & Pérez-Cano, F. J. (2012). Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 527, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.05.015>.
- Massot-Cladera, M., Abril-Gil, M., Torres, S., Franch, A., Castell, M., & Pérez-Cano, F. J. (2014). Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *British Journal of Nutrition*, 112, 1944–1954. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003080>.
- Maurer, L. H., Cazarin, C. B., Quattrin, A., Minuzzi, N. M., Costa, E. L., Morari, J., ... Emanuelli, T. (2019). Grape peel powder promotes intestinal barrier homeostasis in acute TNBS colitis: A major role for dietary fiber and fiber-bound polyphenols. *Food Research International*, 123, 425–439. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.04.068>.
- Morales-Cano, D., Callejo, M., Barreira, B., Mondejar-Parreño, G., Esquivel-Ruiz, S., Ramos, S., ... Perez-Vizcaino, F. (2019). Elevated pulmonary arterial pressure in Zucker diabetic fatty rats. *PLoS ONE*, 14, e0211281. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211281>.
- Morrison, D. J., & Preston, T. (2016). Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes*, 7, 189–200. <https://doi.org/10.1080/19490976.2015.1134082>.
- Nash, V., Ranadheera, C. S., Georgousopoulou, E. N., Mellor, D. D., Panagiotakos, D. B., McKune, A. J., ... Naumovski, N. (2018). The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review. *Food Research International*, 113, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.019>.
- Nie, Q., Chen, H., Hu, J., Fan, S., & Nie, S. (2019). Dietary compounds and traditional Chinese medicine ameliorate type 2 diabetes by modulating gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 848–863. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1536646>.
- Nishitsuji, K., Xiao, J., Nagatomo, R., Umemoto, H., Morimoto, Y., Akatsu, H., ... Tsuneyama, K. (2017). Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Scientific Reports*, 7, 15876. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16189-5>.
- Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., ... Hermoso, M. A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10, 277. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00277>.
- Peng, Y., Yan, Y., Wan, P., Dong, W., Huang, K., Ran, L., ... Cao, Y. (2019). Effects of long-term intake of anthocyanins from Lycium ruthenicum Murray on the organism health and gut microbiota in vivo. *Food Research International*. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108952>.
- Rondanelli, M., Giacosa, A., Faliva, M. A., Perna, S., Allieri, F., & Castellazzi, A. M. (2015). Review on microbiota and effectiveness of probiotics use in older. *World Journal of Clinical Cases*, 3, 156–162. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v3.i2.156>.
- Shin, N. R., Whon, T. W., & Bae, J. W. (2015). Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology*, 33, 496–503. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.06.011>.
- Singh, A. K., Cabral, C., Kumar, R., Ganguly, R., Rana, H. K., Gupta, A., ... Pandey, A. K. (2019). Beneficial effects of dietary polyphenols on gut microbiota and strategies to improve delivery efficiency. *Nutrients*, 11, 2216. <https://doi.org/10.3390/nut11092216>.
- Solano-Aguilar, G., Lakshman, S., Jang, S., Beshah, E., Xie, Y., Sikaroodi, M., ... Davis, C. D. (2018). The effect of feeding cocoa powder and lactobacillus rhamnosus on the composition and function of pig intestinal microbiome. *Current Development in Nutrition*, 2, nzy011. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzy011>.
- Sung, M. M., Kim, T. T., Denou, E., Soltys, C.-L. M., Hamza, S. M., Byrne, N. J., ... Dyck, J. R. B. (2017). Improved glucose homeostasis in obese mice treated with resveratrol is associated with alterations in the gut microbiome. *Diabetes*, 66, 418–425. <https://doi.org/10.2337/db16-0680>.
- Sze, M. A., & Schloss, P. D. (2016). Looking for a signal in the noise: Revisiting obesity and the microbiome. *MBio*, 7, e01018–e1116. <https://doi.org/10.1128/mBio.01018-16>.
- Tomás-Barberán, F. A., & Espín, J. C. (2019). Effect of Food Structure and Processing on (Poly) phenol–Gut Microbiota Interactions and the Effects on Human Health. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 21.1–21.18. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121615>.
- Tzounis, X., Rodríguez-Mateos, A., Vulevic, J., Gibson, G. R., Kwik-Urbe, C., & Spencer, J. P. (2011). Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93, 62–72. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.000075>.
- Vallianou, N., Stratigou, T., Christodoulatos, G. S., & Dalamaga, M. (2019). Understanding the role of the gut microbiome and microbial metabolites in obesity and obesity-associated metabolic disorders: Current evidence and perspectives. *Current Obesity Reports*, 8, 317–332. <https://doi.org/10.1007/s13679-019-00352-2>.
- Van Hul, M., Geurts, L., Plovier, H., Druart, C., Everard, A., Ståhlman, M., ... Cani, P. D. (2018). Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American Journal of Physiology Endocrinology & Metabolism*, 314, E334–E352. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00107.2017>.
- Van Treuren, W., & Dodd, D. (2020). Microbial Contribution to the Human Metabolome: Implications for Health and Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 15, 345–369. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043559>.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied Environmental Microbiology*, 73, 5261–5267. <https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07>.
- World Health Organization (2016). Global Report on Diabetes. Geneva World Health

Resultados – Capítulo tercero

D. Álvarez-Cilleros, et al.

Food Research International 132 (2020) 109058

- Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/204871>.
- Wu, Y., Dong, Y., Atefi, M., Liu, Y., Elshimali, Y., & Vadgama, J. V. (2016). Lactate, a neglected factor for diabetes and cancer interaction. *Mediators of Inflammation*, 2016, 6456018. <https://doi.org/10.1155/2016/6456018>.
- Yang, C., Deng, Q., Xu, J., Wang, X., Hu, C., Tang, H., & Huang, F. (2019). Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats. *Food Research International*, 116, 1202–1211. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.003>.
- Zeng, H., Liu, J., Jackson, M. L., Zhao, F. Q., Yan, L., & Combs, G. F., Jr. (2013). Fatty liver accompanies an increase in Lactobacillus species in the hind gut of C57BL/6 mice fed a high-fat diet. *Journal of Nutrition*, 143, 627–631. <https://doi.org/10.3945/jn.112.172460>.
- Zhao, L., Zhang, Q., Ma, W., Tian, F., Shen, H., & Zhou, M. (2017). A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. *Food and Function*, 8, 4644–4656. <https://doi.org/10.1039/c7fo01383c>.
- Zhou, H. W., Li, D. F., Tam, N. F., Jiang, X. T., Zhang, H., Sheng, H. F., ... Zou, F. (2011). BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity. *The ISME Journal*, 5, 741–749. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.160>.

Supplementary file:

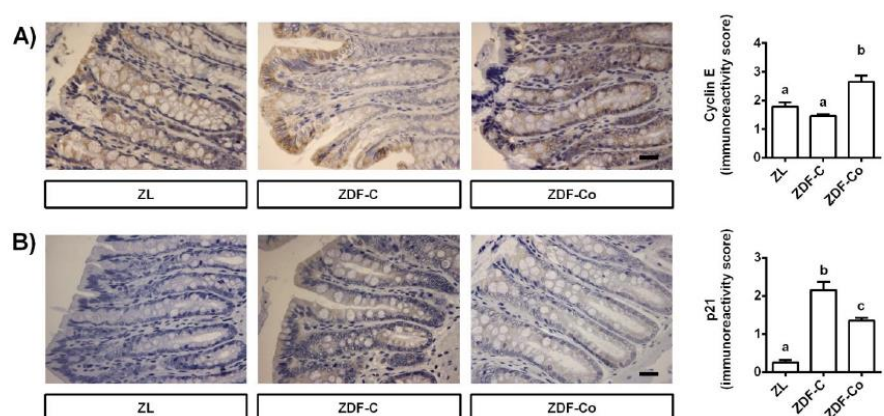
Cocoa diet modulates gut microbiota composition and improves intestinal health in Zucker diabetic rats

David Álvarez-Cilleros¹, Sonia Ramos¹, María Elvira López-Oliva², Fernando Escrivá^{3,4}, Carmen Álvarez^{3,4}, Elisa Fernández-Millán^{3,4*}, María Ángeles Martín^{1,4*}

Legend to Supplementary Figure 1.-

Figure 1.- Effects of cocoa diet on cyclin E and p21 of Zucker lean (ZL), Zucker Diabetic rats fed control diet (ZDF-C) and Zucker Diabetic rats fed cocoa diet (ZDF-Co). Representative immunohistochemistry stained of Cyclin E (A) and p21 (B) (brown-stained) in distal colon and immunoreactive score (scale bar 10 μ m). Values are expressed as mean \pm SD (n = 6-8).

Supplementary Figure 1.-



4. Capítulo cuarto - Efecto antiinflamatorio de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos en modelos de experimentación.

4.1. Resultados inéditos investigación renal.

4.1.1. Estudios en células renales en cultivo.

- ✓ Una concentración alta de glucosa combinada con el LPS induce estrés oxidativo e inflamación en las células renales.

En primer lugar, con el fin de poner a punto un modelo de inflamación que simule la situación que se produce en la DN (hiperglucemia y endotoxemia), se combinaron la misma concentración de glucosa (30mM) que se ha venido empleando en los estudios de células renales y diferentes dosis de LPS. Las células tubulares de riñón NRK-52E se trataron durante 22 horas con 30 mM de glucosa y con las diferentes concentraciones de LPS (0,25-5 µg/mL), y se evaluó la viabilidad celular y la generación de los ROS.

Como se muestra en la **Figura 1A**, las distintas concentraciones de LPS en combinación con la glucosa (30 mM) no provocaron ningún efecto toxico en las células, ya que la viabilidad celular se mantuvo similar a la encontrada en las células control. Sin embargo, cuando se analizó la generación de ROS en las mismas condiciones experimentales, como se observa en la **Figura 1B**, se produjo un incremento de los niveles de los ROS al tratar las células únicamente con la glucosa. De manera similar, aumentó la generación de los ROS cuando se incubaron las células con las dosis del LPS de 0,25-5 µg/mL. Se ha de destacar que el tratamiento con 1 µg/mL de LPS en combinación con la glucosa causó el mayor aumento en los valores de generación de los ROS en las células.

Para evaluar el estado inflamatorio generado por la estimulación con la alta concentración de glucosa y en combinación con las del LPS en las células NRK-52E, se midieron por la técnica del ELISA los niveles de dos citoquinas proinflamatorias clave, como son el TNF- α y la IL-6.

En la **Figura 2A** se puede observar que el tratamiento con la glucosa (30 mM) junto con la concentración más baja del LPS (0,25 µg/mL) no producía un aumento de los niveles del TNF- α . Sin embargo, cuando se utilizaron dosis más elevadas del LPS (0,5-5 µg/mL), sí se observó un incremento dosis-dependiente de la secreción del TNF- α respecto a los niveles del control, siendo similar dicho incremento para las dosis 1 y 2,5 µg/mL de LPS.

En cuanto a los niveles de la IL-6, cuando las células se trataron con la glucosa junto con las dosis menores del LPS (0,25-0,5 µg/mL) no se produjo un aumento de los niveles de esta citoquina (**Figura 2B**). A diferencia de esto, cuando se utilizaron el resto de dosis del LPS (1-5 µg/mL), los niveles de la IL-6

se incrementaron respecto a los de las células control, si bien este aumento fue similar para las distintas dosis del LPS (1-5 $\mu\text{g/mL}$). A la luz de estos datos, se seleccionó la concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$ del LPS para los estudios posteriores, ya que era la dosis más baja y, por tanto, más realista, capaz de aumentar el estrés oxidativo e inducir un estado proinflamatorio sin dañar a las células NRK-52E.

Todos estos resultados sugieren que la combinación de glucosa y el LPS induce estrés oxidativo y un estado proinflamatorio leve y crónico similar al que se produce en la DN.

✓ *La EC y el metabolito colónico de los flavanoles del cacao DHBA protegen a las células renales del estrés oxidativo y la inflamación inducidos por una alta dosis de glucosa y el LPS.*

Para poder evaluar el efecto protector de la EC y los metabolitos colónicos mayoritarios en orina derivados de la ingesta de los flavanoles, las células NRK-52E se preincubaron con la EC, el DHBA, el DHPAA o el HPPA (1-10 μM) durante 2 horas y, a continuación, se estimularon con la glucosa (30 mM) y el LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 22 horas. Se evaluó el estado redox mediante la medida de los niveles de los ROS y la citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6.

En la **Figura 3A** se observa que el pretratamiento con la dosis más baja de los distintos compuestos fenólicos (1 μM) no protegió del aumento de la generación de los ROS en las células renales tratadas con la glucosa y el LPS. Sin embargo, cuando las células se pretrataron con concentraciones más altas de la EC y del DHBA (5-10 μM), los valores de producción de los ROS retornaron a los niveles de las células control. Por el contrario, el pretratamiento con el DHPAA y el HPPA (1-10 μM) no fue capaz de reducir la generación de los ROS en comparación con la dosis del LPS. Estos resultados indican que la EC y el DHBA protegen completamente del estrés oxidativo generado por el estímulo G+LPS, mientras que el DHPAA y el HPPA no mostraron ningún efecto preventivo frente al daño oxidativo.

También se analizó el efecto protector de los compuestos sobre el estado inflamatorio (niveles del TNF- α y de la IL-6) manteniendo las mismas condiciones de estimulación y de pretratamiento comentadas anteriormente en las células NRK-52E. De manera similar a lo que se ha descrito en los resultados anteriores, se observa que las dosis más bajas ensayada de todos los compuestos fenólicos (1 μM) no fue capaz de proteger del aumento de los niveles del TNF- α en las células renales tratadas con la glucosa y el LPS (**Figura 3B**). Además, la concentración más alta (10 μM) del DHPAA y el HPPA

Resultados – Capítulo cuarto

tampoco mostró ese efecto protector frente al aumento de TNF- α inducido por G+LPS. Por el contrario, cuando las células se pretrataron con la concentración de 5 μ M de la EC y del DHBA, los valores del TNF- α disminuyeron hasta los niveles control, mientras que la concentración de 10 μ M indujo niveles del TNF- α similares a los de la dosis de 5 μ M, y ligeramente más altos a los de las células sin tratar. De manera similar a lo que ocurría cuando se evaluó la generación de los ROS, en la **Figura 3C** se muestra que las dosis más bajas de ninguno de los compuestos fenólicos (1 μ M) logró disminuir los niveles de la IL-6 en las células renales tratadas con la glucosa y el LPS. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones más altas de la EC y del DHBA (5-10 μ M) los valores de la IL-6 disminuyeron hasta alcanzar los niveles control. Por su parte, ninguna de las concentraciones del DHPAA y del HPPA fueron capaces de prevenir el estímulo proinflamatorio inducido por G+LPS.

Todos estos resultados sugieren que la EC y el DHBA a una concentración realista (5 μ M) inducen un efecto protector frente al estrés y la inflamación inducido por las altas dosis de glucosa (30mM) junto con el LPS (1 μ g/mL) en las células NRK-52E, mientras que DHPAA y HPPA no fueron capaces de prevenir el daño inducido en este modelo celular.

✓ *La EC y el metabolito colónico de los flavanoles del cacao (DHBA) protegen del aumento de las moléculas de adhesión inducido por las altas dosis de glucosa junto con el LPS.*

La VCAM-1 y la ICAM-1 son moléculas situadas en la membrana plasmática de las células y cuya función es permitir la adhesión de los monocitos y macrófagos a estas. Los niveles de la VCAM-1 medidos por el WB se incrementaron cuando las células NRK-52E se trataron con la mezcla de glucosa y el LPS (**Figura 4A**); sin embargo, este efecto se atenuó cuando las células se trataron previamente con la EC y el DHBA (5 μ M), aunque no se llegaron a alcanzar los niveles de las células controles.

Además, como se puede observar en la **Figura 4B**, también se produjo un aumento de los niveles de la ICAM-1 cuando las células se trataron con las altas dosis de glucosa y el LPS, aunque esto se revertía totalmente cuando las células se preincubaron con la EC y el DHBA (5 μ M). Ambos resultados sugerían que la EC y el DHBA podrían proteger de la inflamación regulando la expresión de algunas proteínas de adhesión en las células NRK-52E.

4.1.2. Estudios renales en animales de experimentación.

✓ Efecto de una dieta rica en cacao sobre la inflamación en la corteza renal de los animales con T2D.

Las ratas ZDF son obesas y están predispuestas a desarrollar T2D. En ambas patologías está presente una inflamación crónica, por lo que el análisis de los marcadores proinflamatorios como el TNF- α , la IL-6, el MCP-1 y el CD68 en la corteza renal de los animales diabéticos y de los animales diabéticos alimentados con el cacao resulta interesante para evaluar el impacto de la dieta rica en cacao sobre el estado inflamatorio renal de las ratas.

La **Figura 5A** muestra que la ingesta de cacao protegió parcialmente del aumento de los niveles del TNF- α en las ratas diabéticas, al igual que sucedió con las concentraciones de la IL-6 (**Figura 5B**). Además, se observó que ambas proteínas aumentaban más su expresión en los túbulos que en los glomérulos.

El análisis de los niveles del MCP-1, del CD68 y de las proteínas relacionadas con la infiltración de monocitos y macrófagos no mostró diferencias entre los distintos grupos de experimentación en el córtex renal de los animales (**Figura 6**).

Todos estos resultados podrían sugerir que la ingesta de una dieta rica en cacao en las ratas diabéticas previene o retrasa el aumento de los niveles del TNF- α y de la IL-6 y, con ello, el proceso inflamatorio.

✓ Efecto de una dieta rica en cacao sobre las moléculas de adhesión en la corteza renal de los animales con T2D.

Como se ha comentado anteriormente, los receptores de membrana VCAM-1 e ICAM-1 son de gran importancia en el desarrollo del proceso inflamatorio. Como se observa en la **Figura 7**, los niveles de la VCAM-1 e ICAM-1 medidos por inmunohistoquímica se incrementaron en las ratas diabéticas alimentadas con la dieta estándar. Sin embargo, cuando los animales diabéticos recibieron la dieta rica en cacao se produjo una recuperación parcial de los valores de estas proteínas. Estos datos sugieren que uno de los mecanismos a través del cual la ingesta de cacao puede prevenir la respuesta inflamatoria es mediante la regulación de la expresión de sus proteínas de adhesión.

Resultados – Capítulo cuarto

✓ Efecto de una dieta rica en cacao sobre la activación del NF- κ B en la corteza renal de los animales con T2D.

El NF- κ B es clave en la regulación del proceso inflamatorio, ya que es el encargado de modular la transcripción de proteínas ligadas a la inflamación; además este factor de transcripción se modula por el estrés oxidativo.

En las ratas ZDF, se observó que la ingesta de cacao previno parcialmente el aumento de los niveles fosforilados de la p-p65-NF- κ B que aparecían incrementados en las ratas diabéticas (**Figura 8**). Los niveles de este factor de transcripción aumentaron principalmente en los túbulos, y también, aunque en menor medida, en los glomérulos. Estos ensayos inmunohistoquímicos parecen sugerir que uno de los mecanismos de protección del cacao frente a la inflamación renal de los animales diabéticos podría ser la inhibición de la vía del NF- κ B, lo que se relaciona con el descenso del estrés oxidativo y la inflamación en la corteza renal de los animales diabéticos.

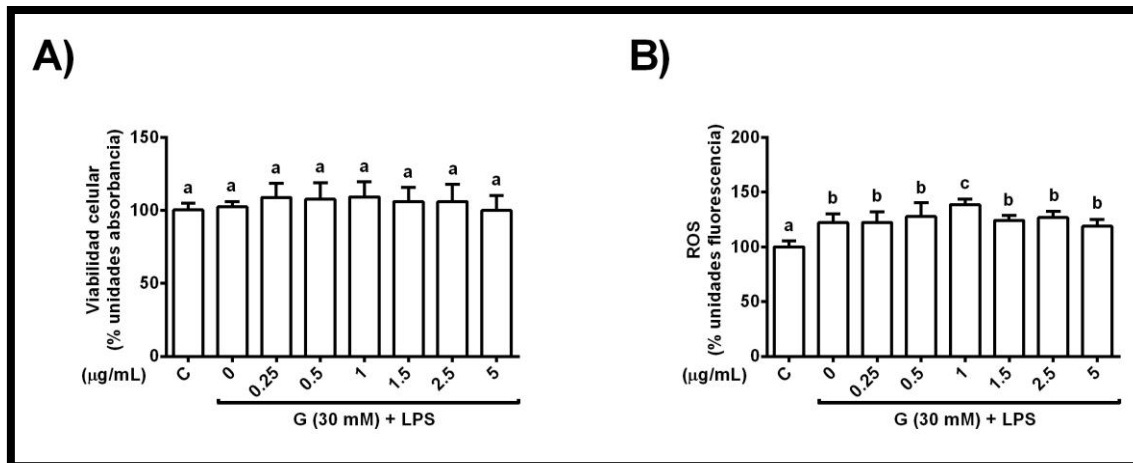


Figura 1. Efecto dosis dependiente del LPS en presencia de una concentración de alta glucosa sobre la viabilidad celular y la generación de los ROS en las células del túbulo proximal renal. Las células NRK-52E se trataron con una concentración fija de glucosa (30 mM) y diferentes dosis de LPS (0,25-5 µg/mL) durante 24 horas. (A) Viabilidad celular medida como el porcentaje de células teñidas con el cristal violeta. (B) Niveles de los ROS. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de los porcentajes respecto al control de 6-10 muestras por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$.

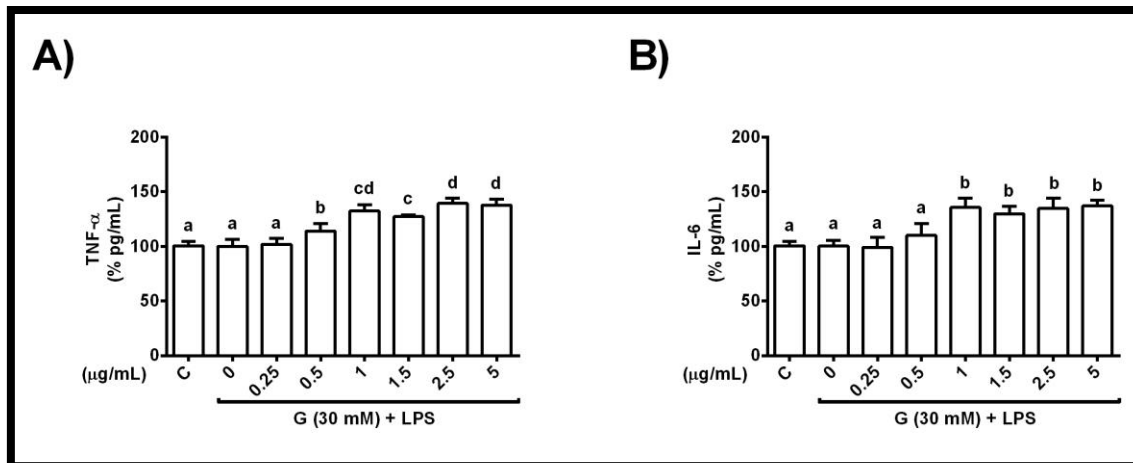


Figura 2. Efecto dosis dependiente del LPS en presencia de una concentración de alta glucosa sobre la secreción del TNF- α y de la IL-6 en las células del túbulo proximal renal. Las células NRK-52E se trataron con la glucosa (30 mM) y las diferentes concentraciones de LPS (0,25-5 μ g/mL) durante 24 horas. (A) Niveles del TNF- α . (B) Niveles de la IL-6. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de los porcentajes respecto al control de 6-10 muestras por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$.

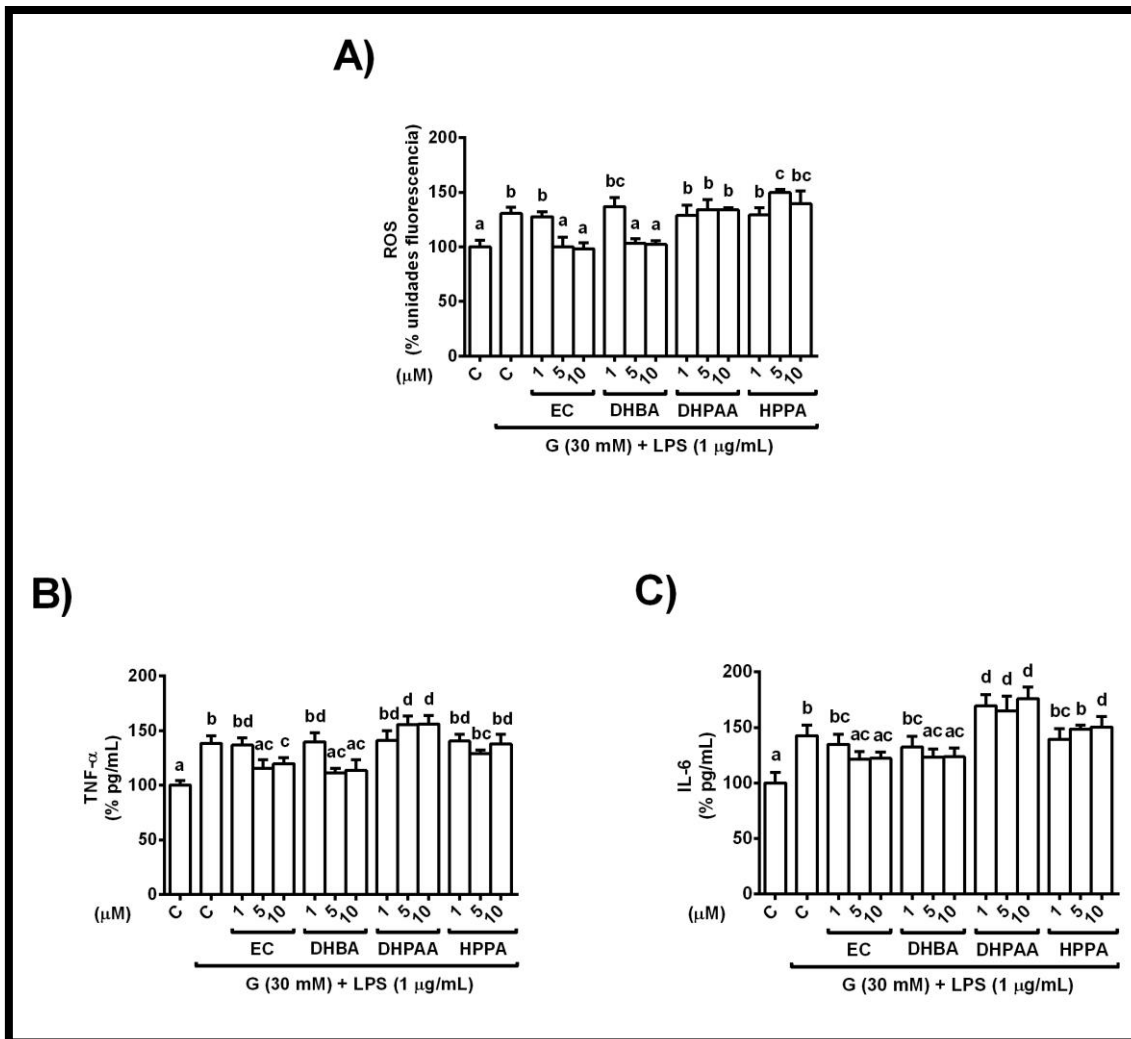


Figura 3. Efecto protector del pretratamiento con la EC y los metabolitos colónicos sobre la generación de los ROS, la secreción del TNF-α y de la IL-6 en las células del túbulo proximal renal incubadas con glucosa y LPS. Las células NRK-52E se pretrataron durante 2 horas con las distintas concentraciones de la EC, del DHBA, del DHPAA y del HPPA (1-10 μM) antes de la estimulación con la glucosa (30 mM) y el LPS (1 μg/mL) durante 22 horas. (A) Niveles de los ROS, (B) del TNF-α y (C) de la IL-6. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de los porcentajes respecto al control de 8-10 muestras por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$.

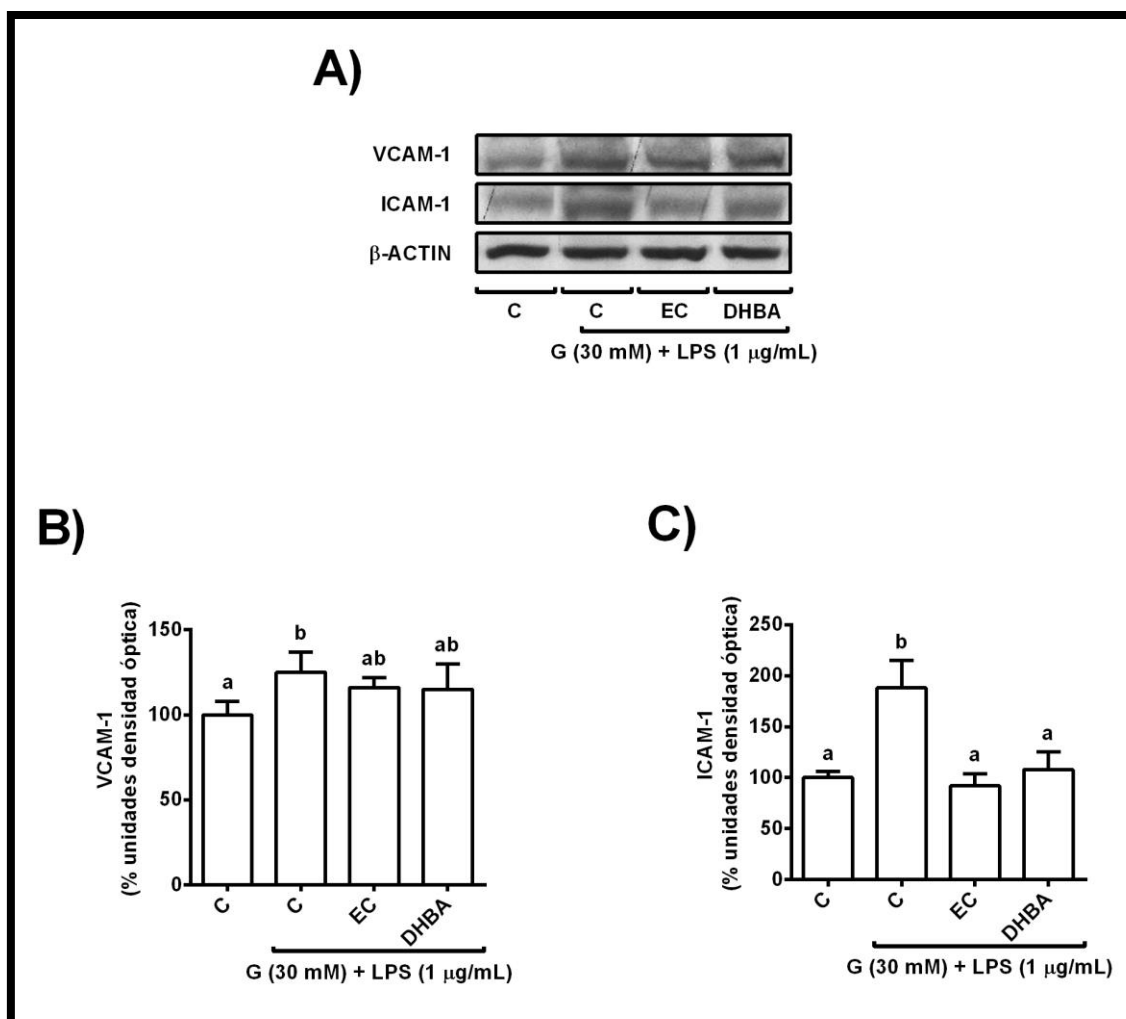


Figura 4. Efecto protector del pretratamiento con la EC y el DHBA sobre las moléculas de adhesión en las células del túbulo proximal renal. Las células NRK-52E se pretrataron durante 2 horas con la EC y el DHBA (5 µM) antes de la estimulación con la glucosa (30 mM) y el LPS (1 µg/mL) durante 22 horas, y se midieron los niveles totales de la VCAM-1 y de la ICAM-1 por WB. (A) Bandas representativas de 6-8 experimentos. (B) Porcentaje de niveles de expresión respecto a la condición control de la VCAM-1. (C) Porcentaje de valores de expresión respecto a la condición control de la ICAM-1. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar normalizados por la β -actina. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$.

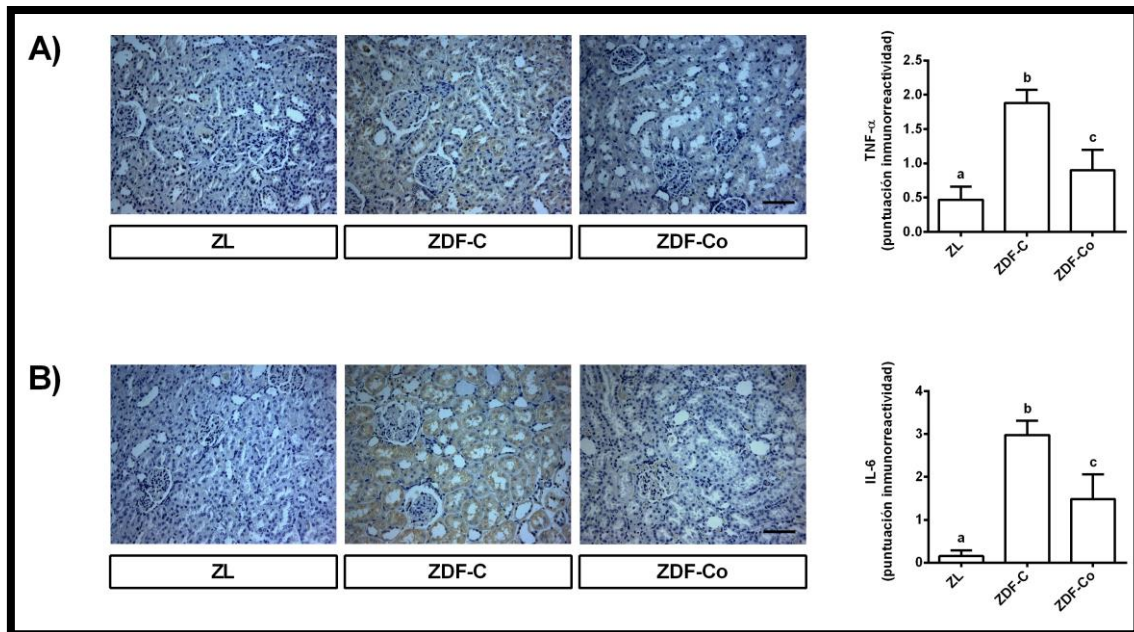


Figura 5. Efecto protector de una dieta rica en cacao sobre los niveles de citoquinas proinflamatorias en la corteza renal de los animales con T2D. Las ratas ZL y las ratas ZDF-C se alimentaron con una dieta estándar, mientras que las ratas ZDF-Co recibieron una dieta rica en cacao durante 10 semanas (10-20 semanas de vida). Imágenes representativas de los cortes histológicos y puntuaciones de inmunoreactividad de las tinciones inmunohistoquímicas. (A) TNF- α y (B) IL-6. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 6-8 animales por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 10 μ m.

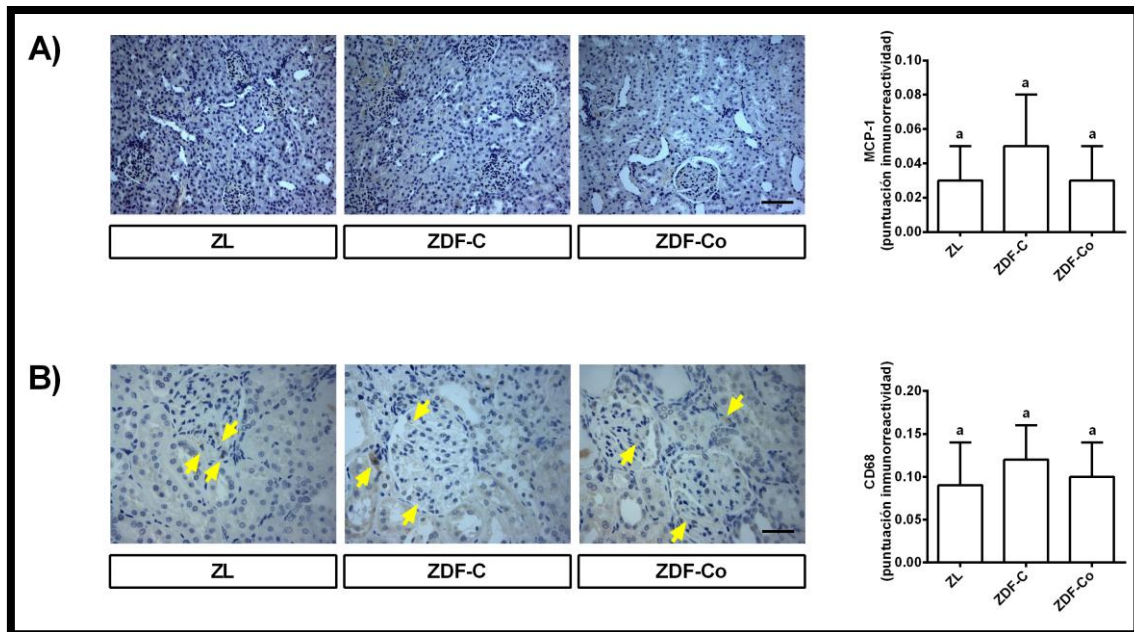


Figura 6. Efecto protector de una dieta rica en cacao sobre proteínas clave relacionadas con la infiltración de monocitos y macrófagos en la corteza renal de los animales con T2D. Las ratas ZL y las ratas ZDF-C se alimentaron con una dieta estándar, mientras que las ratas ZDF-Co recibieron una dieta rica en cacao durante 10 semanas (semanas 10 a 20 de vida). Imágenes representativas y puntuaciones de inmunorreactividad de las tinciones inmunohistoquímicas. (A) MCP-1 y (B) CD68 (las flechas amarillas señalan los macrófagos infiltrados identificados para cada condición). Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 6-8 animales por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 10 μ m.

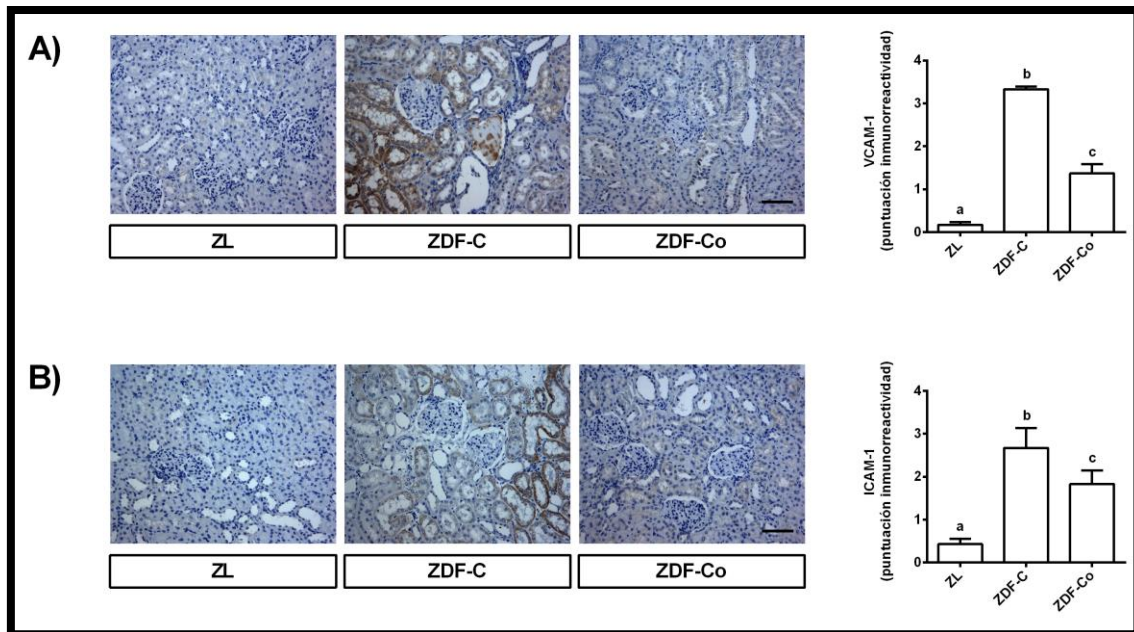


Figura 7. Efecto protector de una dieta rica en cacao sobre las moléculas de adhesión en la corteza renal de los animales con T2D. Las ratas ZL y las ratas ZDF-C se alimentaron con una dieta estándar, mientras que las ratas ZDF-Co recibieron una dieta rica en cacao durante 10 semanas (10-20 semanas de vida). Imágenes representativas y puntuaciones de inmunorreactividad de las tinciones inmunohistoquímicas. (A) VCAM-1 e (B) ICAM-1. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 6-8 animales por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 10 μ m.

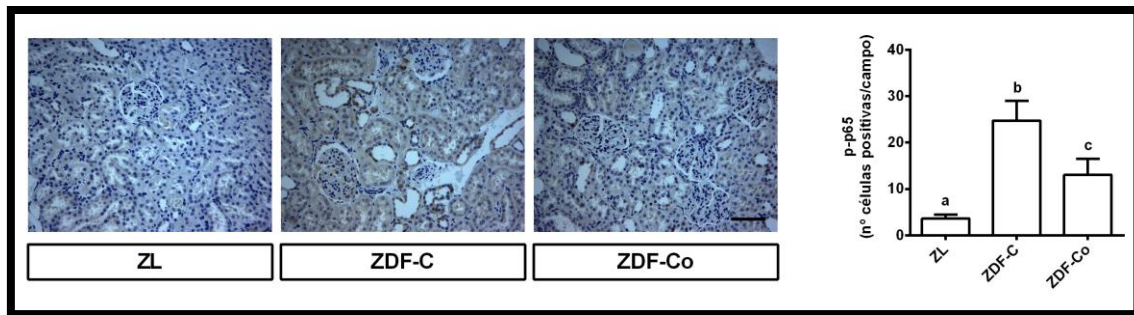


Figura 8. Efecto protector de una dieta rica en cacao sobre los niveles del NF-κB en la corteza renal de los animales con T2D. Las ratas ZL y las ratas ZDF-C se alimentaron con una dieta estándar, mientras que las ratas ZDF-Co recibieron una dieta rica en cacao durante 10 semanas (semanas 10 a 20 de vida). Imágenes representativas y número de células positivas por campo de las tinciones inmunohistoquímicas del p-p65-NF-κB. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 6-8 animales por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 10 μ m.

4.2. Resultados inéditos investigación endotelial.

4.2.1. Estudios en células endoteliales en cultivo.

- ✓ *Los metabolitos colónicos de los flavanoles del cacao protegen a las células endoteliales de la inflamación inducida por el TNF- α .*

En primer lugar, con el fin de poner a punto el modelo de inflamación inducido por el TNF- α en las células EA.hy926, estas fueron tratadas durante 18 horas con dosis fisiológicas del TNF- α (50–500 ng), evaluándose por la técnica del ELISA los niveles de la IL-6 generados en el medio de cultivo tras la estimulación celular. Como se muestra en la **Figura 9A**, la dosis más baja de TNF- α (50 ng) incrementó los niveles de la IL-6 en el medio, lo que confirma su efecto inflamatorio en las células endoteliales. A continuación, se analizó la toxicidad celular producida por esas dosis. Como se observa en la **Figura 9B**, el tratamiento de las células con las distintas dosis del TNF- α no disminuía los valores de cristal violeta respecto al control, lo que mostraba la ausencia de muerte celular en respuesta a esas dosis. Ambos resultados permitieron seleccionar la dosis más baja del TNF- α (50 ng) para los estudios posteriores.

La selección de los metabolitos colónicos con los que se evaluaría el efecto protector sobre la situación inflamatoria, se realizó tratando las células EA.hy926 durante 6 horas con el DHBA, el HPPA o el DHPAA (10 μ M) y con la MIX (12 μ M) antes de la estimulación con el TNF- α (18 horas). En la **Figura 9C** se puede observar que el pretratamiento con los metabolitos de manera individual protegía parcialmente del aumento de la IL-6 en las células endoteliales tratadas con TNF- α . Sin embargo, cuando las células fueron pretratadas con la MIX, los valores de la IL-6 alcanzaron los niveles control, lo que indicaba una protección total utilizando una mezcla de los metabolitos a dosis más bajas (4 μ M). Estos resultados sugerían un efecto sinérgico de los mismos, similar a los que podría ocurrir de manera fisiológica.

Todos estos resultados permitieron concluir que el pre-tratamiento con una mezcla de metabolitos colónicos (MIX 12 μ M) era capaz de proteger frente a la inflamación inducida por el TNF- α (50 ng) en las células EA.hy926.

Resultados – Capítulo cuarto

✓ Los metabolitos colónicos de los flavanoles del cacao inhiben la activación de NF- κ B inducido por el TNF- α en las células endoteliales.

El NF- κ B es una de las proteínas claves en el desarrollo de la respuesta inflamatoria, como se ha mencionado, y favorece la síntesis de enzimas como la iNOS y la COX-2. Por ello, para estudiar los mecanismos moleculares a través de los cuales la mezcla de metabolitos producía ese efecto protector del proceso inflamatorio, se analizaron mediante el WB los niveles de expresión de las proteínas comentadas anteriormente (**Figura 10A**).

En primer lugar, como se muestra en la **Figura 10B**, se analizaron los niveles fosforilados y totales del factor de transcripción NF- κ B (más concretamente de la subunidad p65), y se puede observar que el pretratamiento con la MIX protegió del aumento de los niveles fosforilados de la p65 en las células estimuladas con el TNF- α . Un efecto similar se pudo observar cuando se analizan los niveles de la iNOS (**Figura 10C**) y de la COX-2 (**Figura 10D**): el tratamiento de las células endoteliales con el TNF- α aumentó los valores de ambas, sin embargo, este efecto no se producía cuando las células eran pretratadas con la mezcla. Todos estos resultados parecen sugerir que uno de los mecanismos de protección de los metabolitos colónicos frente a la inflamación podría ser la inhibición del NF- κ B.

✓ Los metabolitos colónicos de los flavanoles del cacao inhiben la adhesión de monocitos inducida por el TNF- α en las células endoteliales.

La IL-6 es una de las primeras citoquinas proinflamatorias en secretarse, por lo que la presencia de esta es indicadora del desarrollo del proceso inflamatorio. Mediante la técnica del ELISA, se puede observar que el pretratamiento con la MIX protege del aumento de los niveles de la IL-6 en las células estimuladas con el TNF- α (**Figura 11A**). Las células endoteliales participan de manera activa en la extravasación de los monocitos del torrente circulatorio durante el proceso inflamatorio; para ello, deben aumentar la expresión de sus receptores de membrana, entre los que se encuentran la ICAM-1 y la VCAM-1, con el fin de que se pueda llevar a cabo la adhesión del monocito a la célula endotelial. Como se muestra en la **Figura 11B**, los niveles de la IL-6, de la ICAM-1 y de la VCAM-1 medidos por WB se incrementaron cuando las células EA.hy926 fueron tratadas con el TNF- α . Sin embargo, este efecto no se produjo cuando las células fueron pretratadas con la mezcla de metabolitos.

Con el fin de evaluar de manera más precisa este proceso se llevaron a cabo ensayos de adhesión celular mediante el marcaje fluorescente de los monocitos THP-1 y su incubación simultánea con las células EA.hy926. En la **Figura 11C** se puede observar la fluorescencia generada por los monocitos THP-1 unidos a las células EA.hy926, encontrándose aumentado el número de monocitos adheridos a las células endoteliales tratadas con el TNF- α , lo que no se producía en aquellas que recibieron el pretratamiento con la MIX.

La cuantificación de esta fluorescencia se muestra en la **Figura 11D**, donde también se puede observar que el tratamiento con la mezcla de los metabolitos previno del aumento de la adhesión monocitaria en las células endoteliales tratadas con el TNF- α . Estos datos parecen sugerir que uno de los mecanismos a través del cual los metabolitos colónicos previenen de la respuesta inflamatoria es modulando la adhesión de los monocitos a las células endoteliales.

4.2.2. Estudios en aorta de animales de experimentación.

✓ Efecto de una dieta rica en cacao sobre la inflamación arterial en las aortas de los animales con T2D.

Para comprobar si este efecto antiinflamatorio de los flavanoles del cacao se produce también *in vivo*, realizamos el estudio de estos parámetros en las ratas Zucker, afectadas de obesidad y de T2D (ZDF). Ambas patologías se caracterizan por el desarrollo del proceso inflamatorio, por lo que se analizaron los marcadores proinflamatorios (como el TNF- α , la IL-6 y el MCP-1) en las arterias de los animales diabéticos y de los animales diabéticos alimentados con el cacao. Como se observa en la **Figura 12A**, el análisis inmunohistoquímico de los niveles del TNF- α en las aortas de los animales no mostró diferencias entre los distintos grupos de experimentación, similar a lo que ocurría con los niveles del MCP-1 (**Figura 12C**). Sin embargo, cuando se analizaron los niveles de la IL-6 (**Figura 12B**), se pudo observar un aumento de ellos en las ratas diabéticas, el cual no se producía en las ratas diabéticas que fueron alimentadas con una dieta rica en cacao. Estos resultados parecen sugerir que la ingesta de una dieta rica en cacao podría prevenir del aumento de los niveles de la IL-6 en las arterias de las ratas diabéticas, y con ello del proceso inflamatorio asociado a esta patología.

Resultados – Capítulo cuarto

✓ Efecto de una dieta rica en cacao sobre la activación del NF- κ B en las aortas de los animales con T2D.

El NF- κ B es un factor de transcripción que regula la síntesis de numerosas proteínas inflamatorias. Un ejemplo de ello es la regulación que ejerce sobre la síntesis de la COX-2 y de la iNOS, siendo esta última de gran importancia en el tejido vascular por su capacidad para producir el NO. Como se observa en la **Figura 13A**, la ingesta de cacao protegió del aumento de los niveles fosforilados de la p65-NF- κ B en las ratas diabéticas. Un efecto similar se puede observar cuando se analizan los niveles de la iNOS (**Figura 13B**), donde la protección del aumento de los niveles de esta enzima fue parcial cuando las ratas diabéticas fueron alimentadas con una dieta rica en cacao. Por otro lado, los niveles de expresión de la enzima COX-2 no se vieron alterados entre las distintas poblaciones de ratas, como se muestra en la **Figura 13C**. Estos ensayos inmunohistoquímicos parecen sugerir que uno de los mecanismos de protección del cacao frente a la inflamación de los animales diabéticos podría ser la inhibición de la vía del NF- κ B.

✓ Efecto de una dieta rica en cacao sobre las moléculas de adhesión en las aortas de los animales con T2D.

Las células endoteliales de las arterias, por encontrarse tapizando el lumen vascular, presentan una gran cantidad de moléculas de superficie con capacidad de interaccionar con otras células, como es el caso de la ICAM-1 y la VCAM-1. Como se muestra en la **Figura 14A**, los niveles de la ICAM-1 medidos por inmunohistoquímica se incrementaron en las ratas diabéticas; sin embargo, se produjo una recuperación parcial de los valores de esta proteína cuando los animales diabéticos fueron alimentados con una dieta rica en cacao. De manera similar, en la **Figura 14B** se pueden observar los niveles de expresión de la VCAM-1, encontrándose aumentados en los animales diabéticos, lo que se revertía de manera parcial en aquellas que estuvieron bajo los efectos del cacao. Estos datos podrían sugerir que uno de los mecanismos a través del cual la ingesta de cacao previene de la respuesta inflamatoria es regulando la expresión de sus proteínas de adhesión.

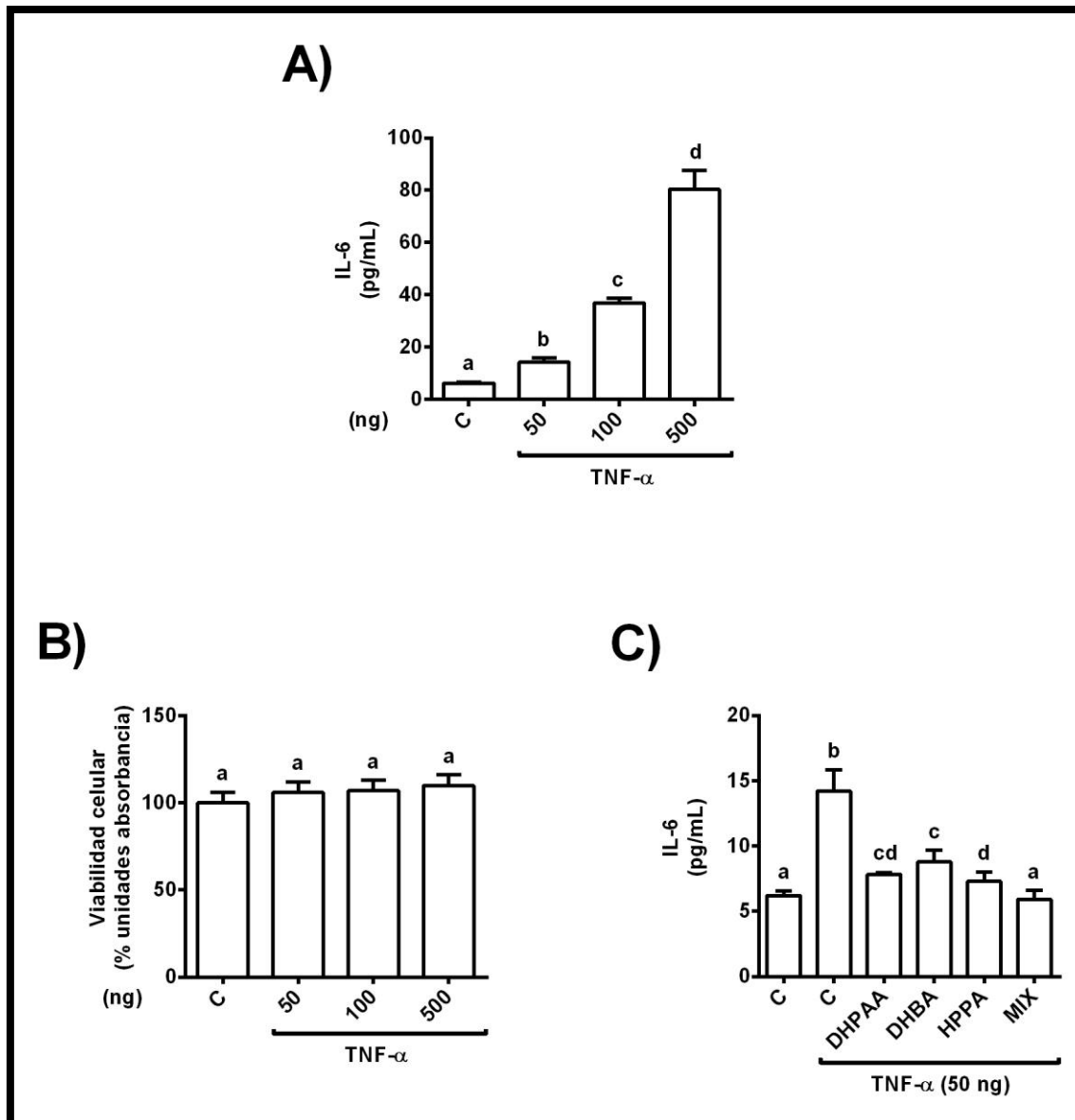


Figura 9. Efecto directo del TNF- α y efecto protector de los metabolitos colónicos sobre la secreción de la IL-6 y sobre la viabilidad celular en las células endoteliales. Las células EA.hy926 fueron tratadas con el TNF- α (50-500 ng) durante 18 horas y se midieron: (A) los niveles de IL-6 y (B) la viabilidad celular. (C) Las células EA.hy926 fueron pretratadas con el DHPAA, el DHBA, el HPPA o el DHPAA (10 μ M) y con la MIX (12 μ M) durante 6 horas antes de la estimulación con el TNF- α (50 ng) durante 18 y se midieron los niveles de IL-6. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 10-12 muestras por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$.

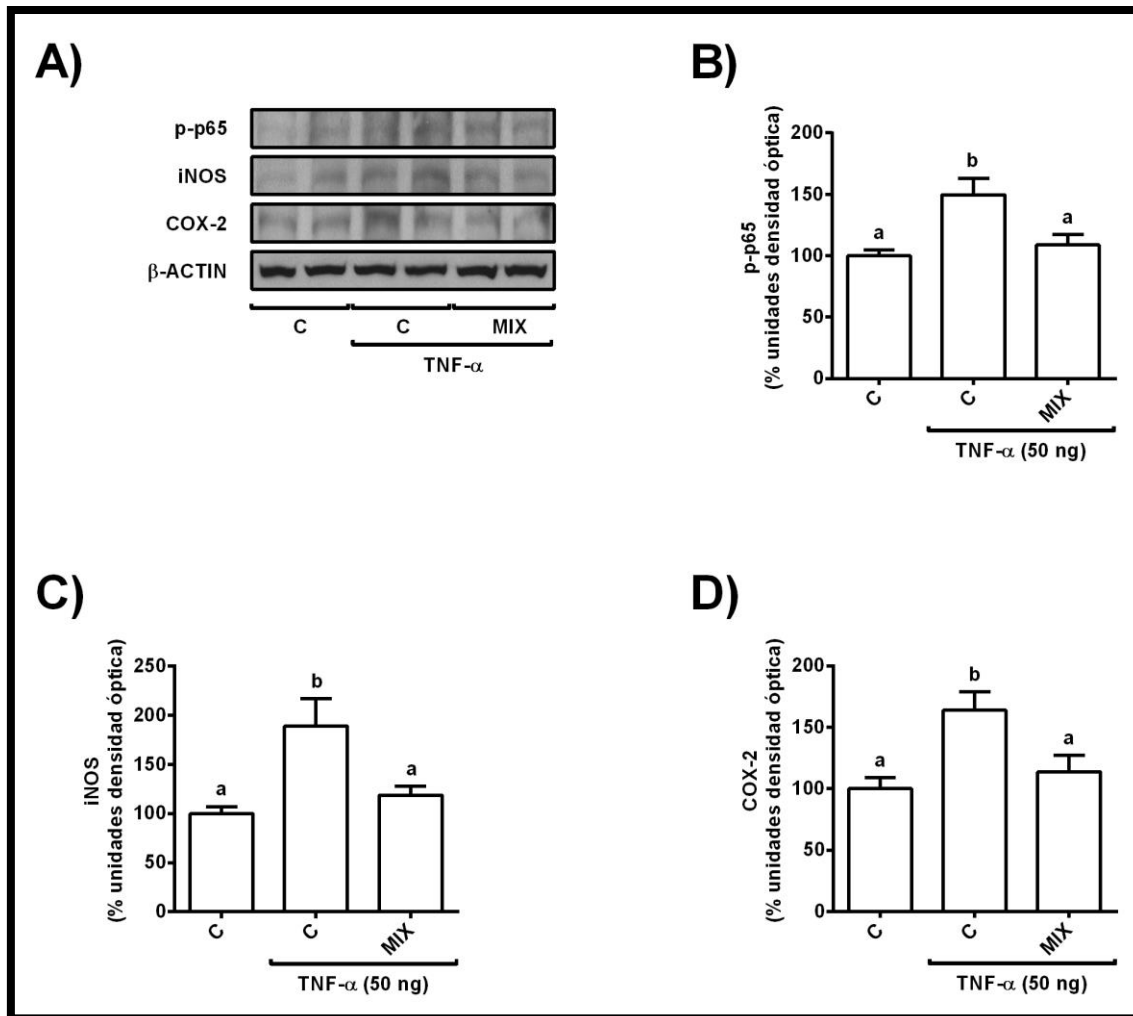


Figura 10. Efecto protector de la mezcla de metabolitos colónicos sobre la señalización del NF-κB en las células endoteliales. Las células EA.hy926 fueron pretratadas con la MIX (12 μM) durante 6 horas antes de la estimulación con el TNF-α (50 ng) durante 18 y se midieron los niveles fosforilados del p65-NF-κB y los niveles totales de la iNOS y de la COX-2 por WB. (A) Bandas representativas de 6-8 experimentos. (B) Porcentaje de expresión respecto a la condición control del p-p65-NF-κB. (C) Porcentaje de expresión respecto a la condición control de la iNOS. (D) Porcentaje de expresión respecto a la condición control del COX-2. Los datos representados corresponden a las medias ± la desviación estándar normalizados por la β-actina. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$.

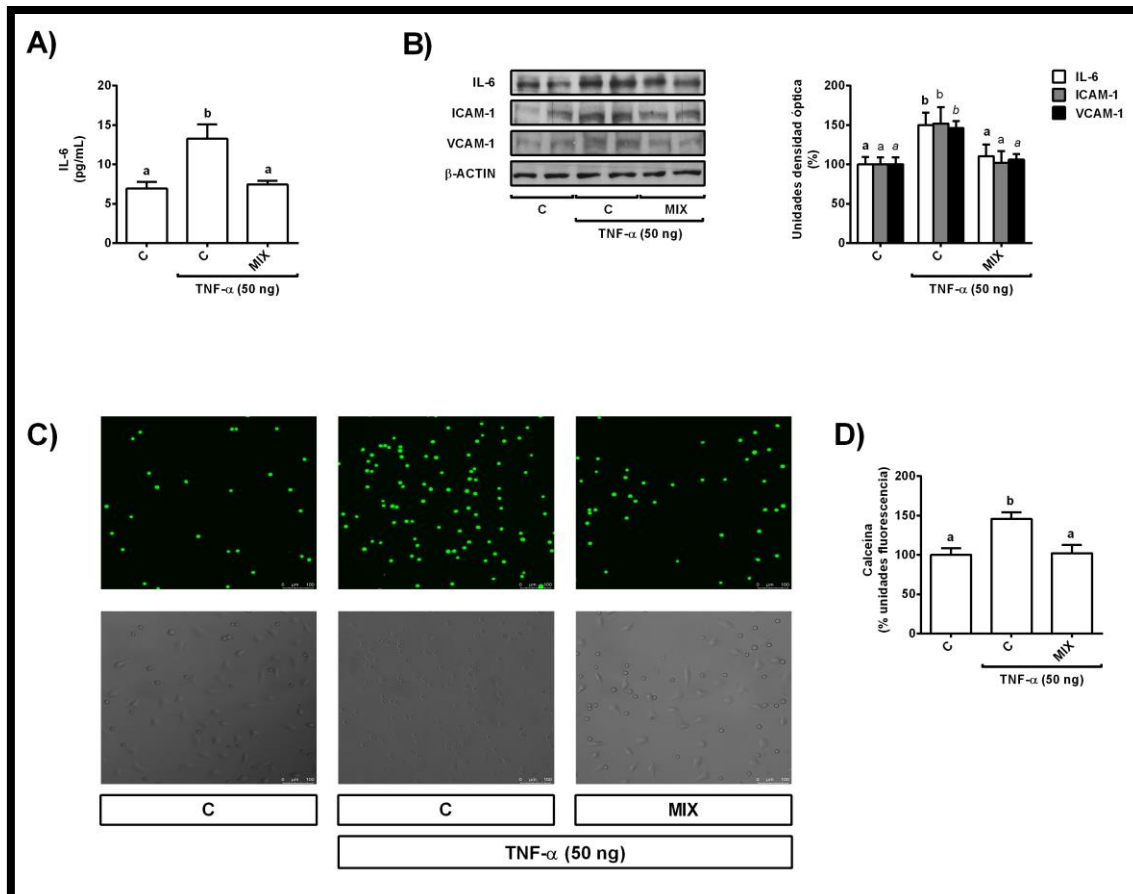


Figura 11. Efecto protector de la mezcla de metabolitos colónicos sobre la adhesión de monocitos en las células endoteliales. Las células EA.hy926 fueron pretratadas con la MIX (12 μ M) durante 6 horas antes de la estimulación con el TNF- α (50 ng) durante 18 y se midieron los niveles de la IL-6 por ELISA; los niveles totales de la IL-6, de la ICAM-1 y de la VCAM-1 por WB; y la adhesión de los monocitos por fluorescencia. (A) Niveles de la IL-6. (B) Bandas representativas de 6-8 experimentos y porcentaje de expresión respecto a la condición control de la IL-6, de la ICAM-1 y de la VCAM-1. (C) Imágenes de microscopia de fluorescencia con emisión en verde para los THP-1 adheridos donde las imágenes inferiores representan las imágenes superiores con contraste de fase. (D) Porcentaje de fluorescencia de la calceína AM respecto a la condición control. *Para los ensayos de ELISA Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 10-12 muestras por cada condición. Para los ensayos de WB los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar normalizados por la β -actina. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 100 μ m.*

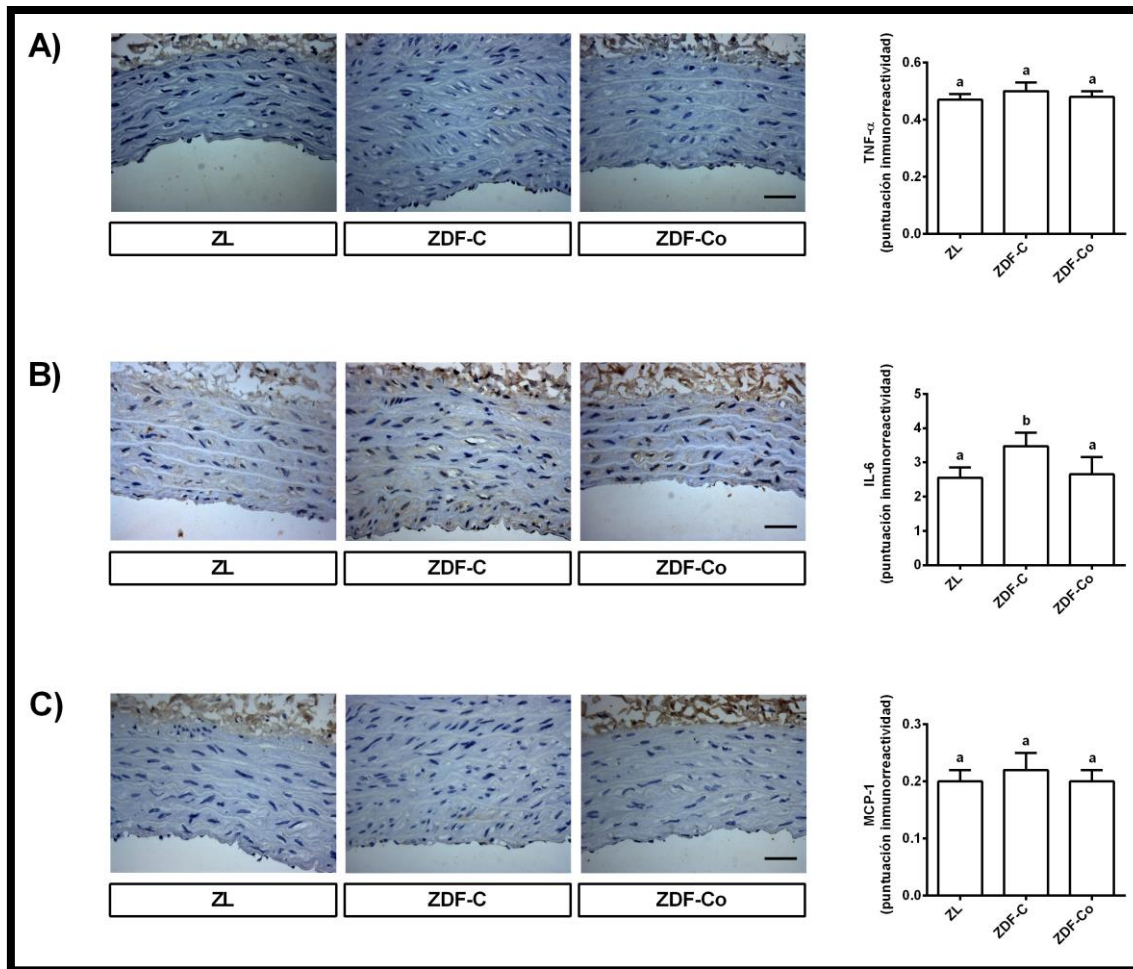


Figura 12. Efecto protector de una dieta rica en cacao sobre la inflamación en la aorta de los animales con T2D. Las ratas ZL y las ratas ZDF-C fueron alimentadas con una dieta estándar, mientras que las ratas ZDF-Co fueron alimentadas con una dieta rica en cacao durante 10 semanas hasta la semana 20 de vida. Imágenes representativas y puntuaciones de inmunorreactividad (basadas en la intensidad de color marrón) de las tinciones inmunohistoquímicas. (A) TNF- α , (B) IL-6 y (C) MCP-1. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 6-8 animales por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 10 μ m.

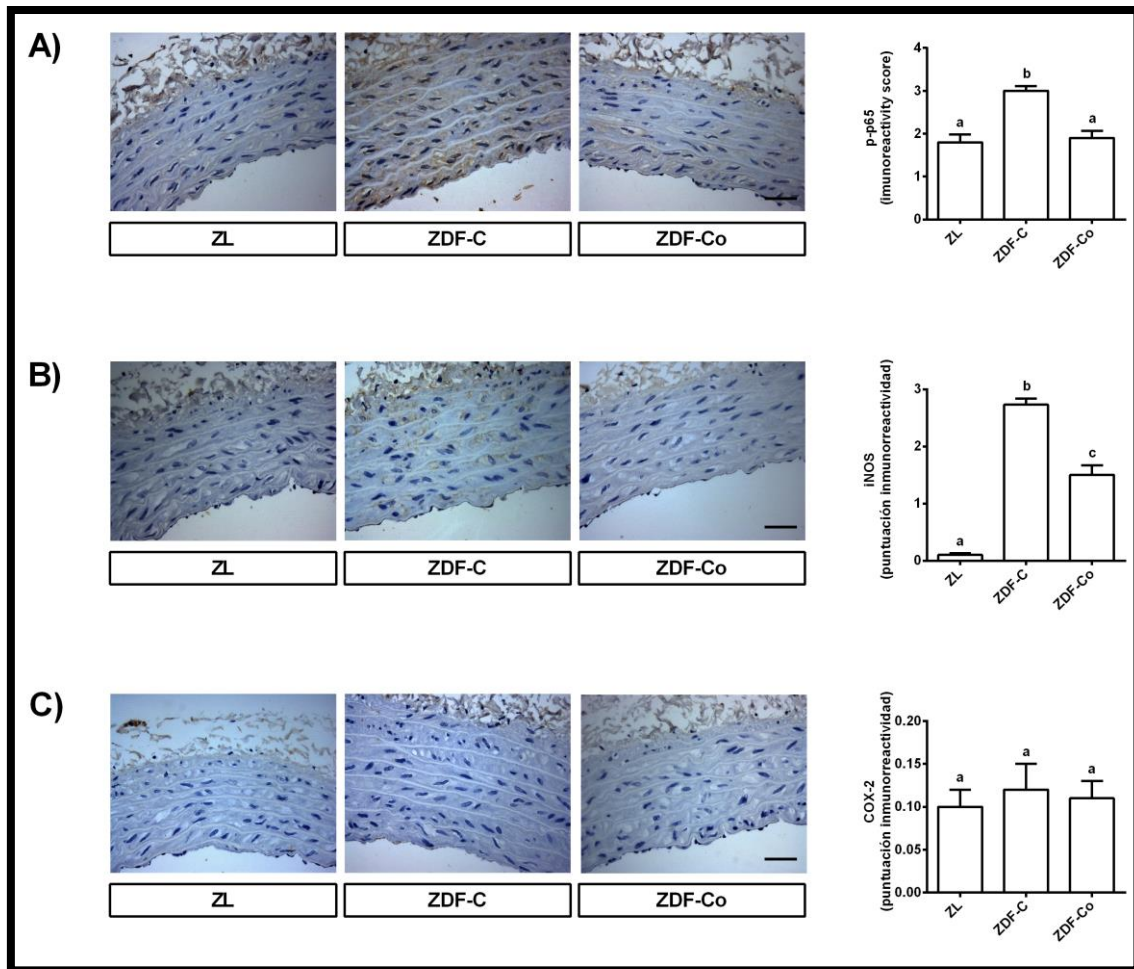


Figura 13. Efecto protector de una dieta rica en cacao sobre la vía del NF-κB en la aorta de los animales con T2D. Las ratas ZL y las ratas ZDF-C fueron alimentadas con una dieta estándar, mientras que las ratas ZDF-Co fueron alimentadas con una dieta rica en cacao durante 10 semanas hasta la semana 20 de vida. Imágenes representativas y puntuaciones de inmunorreactividad (basadas en la intensidad de color marrón) de las tinciones inmunohistoquímicas. (A) p-p65-NF-κB, (B) iNOS y (C) COX-2. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 6-8 animales por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 10 μ m.

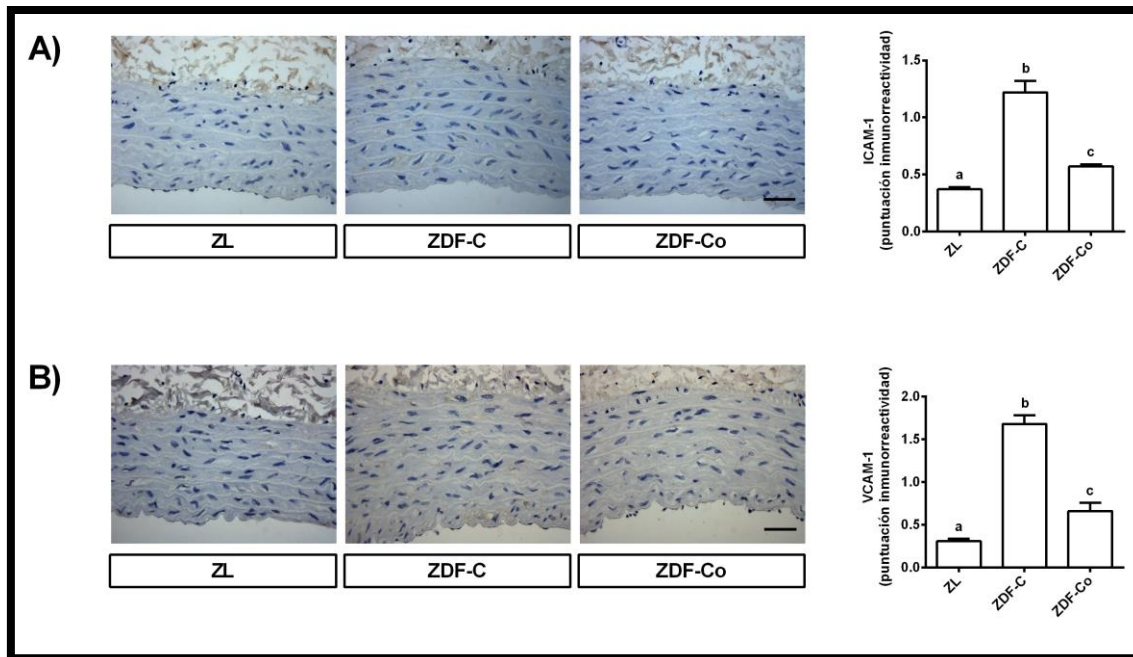


Figura 14. Efecto protector de una dieta rica en cacao sobre las moléculas de adhesión en la aorta de los animales con T2D. Las ratas ZL y las ratas ZDF-C fueron alimentadas con una dieta estándar, mientras que las ratas ZDF-Co fueron alimentadas con una dieta rica en cacao durante 10 semanas hasta la semana 20 de vida. Imágenes representativas y puntuaciones de inmunorreactividad (basadas en la intensidad de color marrón) de las tinciones inmunohistoquímicas. (A) ICAM-1 y (B) VCAM-1. Los datos representados corresponden a las medias \pm la desviación estándar de 6-8 animales por cada condición. Las distintas letras colocadas sobre las barras indican diferencias significativas entre ellas con un valor de $p < 0,05$. Barra de escala: 10 μ m.

1. Capítulo primero - Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo renal en modelos de experimentación.

1.1. Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre la homeostasis glucídica de las células tubulares proximales NRK-52E.

La DN es una complicación diabética y constituye una de las principales causas que conduce a la enfermedad renal crónica¹⁷⁰. De hecho, la alteración de la homeostasis glucídica es crucial en el inicio y desarrollo de la DN; así, la hiperglucemia crónica se relaciona con los cambios túbulo-intersticiales que acompañan a la progresiva disfunción renal, y la reabsorción renal de la glucosa tiene un papel fisiopatológico en la diabetes¹⁷⁰. Por tanto, el control a largo plazo de la glucemia es muy importante para la prevención de la DN. En este sentido, distintos estudios en animales y humanos han puesto de manifiesto que los flavonoides podrían poseer efectos antidiabéticos; además, estos compuestos naturales parecen ser seguros por su escasa o nula toxicidad¹⁷¹. No obstante, se ha de considerar que el impacto de los compuestos fenólicos en la salud no solo depende de los propios polifenoles, sino también de los metabolitos derivados de su ingesta, que incluyen a los ácidos fenólicos^{172,173}.

La EC es el flavanol más abundante en el cacao, aunque también está presente en cantidades menores en bebidas y frutas, como el té y las uvas^{171,174}. Después de la ingesta de cacao, una pequeña cantidad de flavonoides se absorbe en el intestino delgado; sin embargo, la mayoría de estos compuestos naturales continúan intactos hasta el colon donde se transforman en ácidos fenólicos para, a continuación, ser absorbidos¹⁷². En este sentido, distintos estudios en humanos han demostrado que los principales ácidos fenólicos derivados de la ingesta de alimentos ricos en flavanoles, y que aparecen de manera significativa en la orina, son el DHBA, el DHPAA y el HPPA¹⁷². Además, se debe tener en cuenta que los compuestos puros se pueden acumular en los tejidos porque pueden sufrir ciclos de conjugación-deconjugación¹⁷⁵. Así pues, para llevar a cabo estos estudios se han seleccionado la EC como compuesto puro, y los ácidos DHBA, DHPAA y HPPA como principales metabolitos colónicos derivados la ingesta de alimentos ricos en flavanoles.

En estas investigaciones, los compuestos fenólicos mencionados se han empleado en concentraciones de entre 1–20 μ M, valores que se encuentran dentro del rango recomendado para realizar estudios *in vitro*, ya que son concentraciones que pueden estar presentes en fluidos biológicos después de la ingesta de flavanoles¹⁷². También, en este modelo celular y con objeto de simular una situación diabética, las células del túbulo proximal renal se

Discusión integradora – Capítulo primero

incubaron con altas dosis de glucosa^{176–178}, ya que se ha observado que estas condiciones experimentales conducen a una respuesta inflamatoria, y alteraciones en el equilibrio redox y en la vía de la PI3K/AKT de manera similar a lo que ocurre en una situación de diabetes^{177–179}.

En condiciones fisiológicas, los riñones tienen un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis glucídica, ya que son capaces de realizar la gluconeogénesis, captar la glucosa desde la circulación sanguínea, reabsorber la glucosa desde la orina y, recientemente, se ha visto que la señalización de la insulina también podría tener un papel relevante sobre las células renales^{180,181}. Sin embargo, en la DN, una de las primeras alteraciones fisiopatológicas que se produce es la disminución de la función renal debido a la disfunción tubular que se ha asociado con la glucotoxicidad generada por la hiperglucemia^{170,182}.

En cuanto a la reabsorción y transporte de la glucosa, en una situación no patológica, en las células del túbulo proximal renal el transportador SGLT-2 reabsorbe un 90% de la glucosa filtrada por los riñones, y el transporte transcelular de la hexosa es facilitado por el GLUT-2^{180,183}; por tanto, parece claro que la modulación de estos transportadores contribuye a mantener la homeostasis glucídica. En relación con la regulación de los transportadores de glucosa, el tratamiento con los compuestos fenólicos (la EC, el DHBA y el DHPAA) y la alta concentración de glucosa no modificaron los niveles de estas proteínas, pero la EC y el DHBA disminuyeron la captación de glucosa. De acuerdo con nuestros resultados distintas investigaciones han mostrado que durante la diabetes o tras la ingesta de compuestos fenólicos la expresión de ambos transportadores no se alteró^{184,185}. Se ha sugerido que la modificación en los niveles del GLUT-2 y del SGLT-2 podría estar relacionada con los valores de glucemia y con la duración de la diabetes^{184,185}, lo que podría explicar la ausencia de modulación de los transportadores de glucosa en nuestros modelos experimentales. Además, se ha demostrado que diferentes productos naturales, como la florizina y los extractos de plantas enriquecidos con flavonoides son capaces de inhibir la actividad del SGLT-2 y reducir la glucemia¹⁸⁶. Estas observaciones se relacionan con los resultados obtenidos, ya que la disminución de la captación de glucosa observada en las células tratadas con la EC y con el DHBA podría venir dada por una inhibición de la actividad del SGLT-2 sin que se afecten los niveles de expresión de dicha proteína; de hecho, este constituye el mecanismo de acción de algunos medicamentos inhibidores del SGLT-2 como la dapagliflozina, la empagliflozina, y también de la florizina u otros productos naturales^{186–189}.

En relación con la homeostasis glucídica, las células del túbulo proximal renal también contribuyen a su mantenimiento porque son capaces de llevar a cabo la gluconeogénesis; de hecho, estas células son sensibles a la hiperglucemia porque captan la glucosa de manera insulino-independiente. Por el contrario, en las células, la insulina tiene un papel antigluconeogénico, ya

que inhibe la síntesis de glucosa mediante la disminución de la expresión de los genes relacionados con dicho proceso, como la enzima PEPCK, proteína clave para la modulación de la gluconeogénesis^{180,190}. En nuestro modelo experimental, en las células NRK-52E, el tratamiento con la EC, con el DHBA y con el DHPAA, así como el pretratamiento con la EC y con el DHPAA protegieron del aumento de los niveles de la PEPCK observado en las células tratadas con altas dosis de glucosa, y disminuyeron los valores de la PEPCK por debajo de los valores control. De manera similar, la administración de compuestos naturales como el cinamaldehído y la apocinina redujeron los niveles de esta enzima en el hígado de animales diabéticos^{191–193}. Además, se ha descrito que la EC y otros flavonoides, como la naringenina o el resveratrol, son capaces de modular la gluconeogénesis en modelos *in vitro* e *in vivo* de diabetes y obesidad^{194–198}.

Durante la DN se produce la inhibición de la señalización de la insulina, lo que puede conducir a un aumento de la gluconeogénesis, y contribuir a la hiperglucemia¹⁹⁰. Por tanto, la activación de la cascada de señalización iniciada por el IR-IRS-1, que estimula la vía de la PI3K/AKT necesaria para que se lleven a cabo los efectos del metabolismo de la insulina, es responsable de la inhibición de la GSK3 y la activación de la GS, y puede constituir una estrategia para mejorar la homeostasis glucídica. En este sentido, los compuestos fenólicos (la EC, el DHBA y el DHPAA) aumentaron la fosforilación de los residuos de tirosina y los niveles totales del IR y del IRS-1, así como los valores fosforilados de la AKT y de la GSK3. También, estos compuestos naturales fueron capaces de disminuir los niveles de la p-GS en las células NRK-52E. Por su parte, la alta concentración de glucosa inhibió la señalización de la insulina, lo que condujo a una disminución de los niveles fosforilados de los residuos de tirosina y totales del IR, de la p-GSK3 y a un aumento de la p-AKT en células NRK-52E; por el contrario, el pretratamiento de las células con la EC y el DHPAA previno este efecto inhibitorio observado sobre la señalización de la insulina en presencia de altas concentraciones de glucosa. De manera análoga, los polifenoles procedentes de *Hibiscus sabdariffa* fueron capaces de reactivar la vía de la insulina, ya que disminuyeron los niveles de la fosforilación inhibitoria de los residuos de serina del IRS-1 sin modificar los niveles totales de esta proteína, y también aumentaron los valores de la p-PI3K en células tubulares proximales renales resistentes a la insulina¹⁹⁹. Además, la alimentación de ratas resistentes a la insulina con la quercetina y con la rutina restauró los niveles fosforilados en los residuos de tirosina del IR, del IRS-1 y de la AKT, y redujo los niveles fosforilados en residuos de serina del IRS-1 en el riñón sin modificar los valores totales de dichas proteínas²⁰⁰. También, el tratamiento de preadipocitos con un extracto de semillas de uva rico en procianidinas activó al IR mediante el incremento de los niveles fosforilados en los residuos de tirosina de la proteína²⁰¹.

Discusión integradora – Capítulo primero

En relación con la AKT, se ha de considerar que, debido a su función en la célula, la activación de esta proteína por los altos niveles de glucosa se acompañó de la disminución de los niveles fosforilados de la GSK3 y, por tanto, del incremento de los niveles fosforilados de la GS, apuntando al bloqueo de la vía de la insulina. Sin embargo, un aumento de los niveles fosforilados de la AKT también se ha asociado con alteraciones en el metabolismo lipídico y con el estrés oxidativo^{202,203}. Por el contrario, un incremento de los niveles fosforilados de la GSK3 se ha relacionado con un papel protector en las células del túbulo proximal renal²⁰⁴. Además, se ha observado que una hiperglucemia de larga duración podría dar lugar a la acumulación de glucógeno en los túbulos proximales renales de las ratas diabéticas, aunque este efecto se revirtió administrando un extracto de té verde en dichos animales²⁰⁵. Así, de acuerdo con estos estudios, el pretratamiento con la EC o con el DHPAA de las células NRK-52E incubadas con altas dosis de glucosa aumentó los niveles fosforilados de la AKT y de la GSK3, y disminuyó los de la GS; estas regulaciones podrían indicar que el mecanismo de actuación de los compuestos fenólicos en las células NRK-52E podría venir dado por una mejora de la funcionalidad celular que se traduciría, entre otros efectos, en un refuerzo de la vía de señalización de la insulina.

Durante la DN se produce la inhibición de la AMPK, que es una proteína implicada en la regulación del metabolismo celular. De hecho, se ha sugerido que dicha inhibición podría ser la responsable del inicio de la enfermedad renal²⁰⁶; así pues, la participación de la AMPK en el mantenimiento de la homeostasis glucídica parece crucial. En este sentido, la EC y el DHPAA fueron capaces de aumentar los niveles fosforilados de la AMPK, evitando así la disminución provocada por el tratamiento de las células tubulares con una alta dosis de glucosa. De manera similar, el tratamiento de las ratas diabéticas y de las células tubulares con el resveratrol y la zerumbona contribuyó a proteger frente a la disminución de los niveles fosforilados de la AMPK causada por altas concentraciones de glucosa y, por consiguiente, mejoró el metabolismo celular^{207,208}. Del mismo modo, la administración de oligonol o de té verde a ratones diabéticos logró reducir la glucemia y aumentar los niveles fosforilados de la AMPK²⁰⁹. Por lo tanto, la reactivación de la AMPK en situaciones de altas concentraciones de glucosa podría estar asociada a una mejora de la homeostasis en el riñón²⁰⁷⁻²⁰⁹.

Es de destacar que la AKT y la AMPK, que se encuentran desreguladas durante la DN^{206,210}, son proteínas claves en la modulación de las vías de señalización relacionadas con la energía. Ambas proteínas podrían estar involucradas en la modulación de la homeostasis glucídica en el riñón. Así, la inhibición de la AKT anuló los efectos beneficiosos observados por el pre- y el tratamiento con los compuestos fenólicos (la EC, el DHBA y el DHPAA) en las células del túbulo proximal renal en condiciones fisiológicas y en las células

expuestas a altas concentraciones de glucosa; se produjo un ascenso en los niveles de la PEPCK, así como en la producción de glucosa y un descenso en la captación de dicha hexosa. De manera similar, se ha visto que en las células hepáticas la AKT participa en la inhibición de la PEPCK y la producción de glucosa cuando estas son tratadas con la EC y con el extracto de clavo^{211,212}. También los compuestos fenólicos han demostrado prevenir o mejorar la transición epitelio-mesénquima en las células del túbulo proximal de los riñones de las ratas diabéticas¹⁹⁹, así como contribuir a preservar la función renal (incluida la ruta de señalización insulina) en ratas alimentadas con fructosa que presentan daño renal²⁰⁰. Por último, se ha de mencionar también que la AKT parece tener un papel importante en la restauración de las funciones alteradas del SGLT en las células tubulares proximales renales tratadas con altas concentraciones de glucosa²⁰³. Todas estas observaciones podrían indicar que la EC y el DHPAA modulan la homeostasis glucídica en las células tubulares mediante la regulación de la AKT. Por su parte, la AMPK también parece estar involucrada en la modulación de la homeostasis glucídica. Así, la inhibición de la AMPK anuló los efectos protectores derivados del pretratamiento con la EC y el DHPAA en las células NRK-52E bajo condiciones de altas concentraciones de glucosa; se produjo un incremento en los niveles de la PEPCK y en la producción de glucosa junto con un descenso en la captación de la hexosa. De acuerdo con nuestros resultados, se ha demostrado que las moléculas activadoras de la AMPK mejoran la captación de la glucosa al aumentar la actividad de sus transportadores^{210,213}. Además, se ha descrito que el tratamiento de pollos con metformina activó a la AMPK, lo que provocó una reducción de los niveles de la PEPCK, indicando la existencia de una posible relación entre la AMPK y la PEPCK²¹⁴. Por otro lado, alimentos como el cacao y flavonoides como la naringenina o el resveratrol fueron capaces de modular los niveles de la PEPCK en diferentes líneas celulares y modelos animales de diabetes^{191,194,196,197,215}. Todas estas consideraciones parecen indicar que la AMPK regula a proteínas claves relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis glucídica, y que la EC y el DHPAA contribuyen a su regulación en las células del túbulo proximal renal.

En resumen, en condiciones fisiológicas, la EC y el metabolito colónico DHBA son capaces de disminuir la absorción de glucosa sin afectar a los niveles de los principales transportadores de glucosa en las células del túbulo proximal renal. También ambos compuestos aumentan los niveles fosforilados en los residuos de tirosina y en los totales del IR y del IRS-1, lo que se acompaña de una activación de la vía PI3K/AKT. Además, la EC y el DHBA regulan negativamente los niveles de la enzima gluconeogénica PEPCK, y modulan la producción de glucosa renal a través de la AKT. Por otro lado, en una situación patológica, la EC y el DHPAA atenúan el bloqueo de la señalización de insulina inducido por una alta dosis de glucosa protegiendo de la disminución de los niveles fosforilados en residuos de tirosina y los totales

del IR, así como de la inhibición de las vías de la PI3K/AKT y de la AMPK. Además, la EC y el DHPAA previenen o retrasan la disfunción en las células renales causada por las altas dosis de glucosa al impedir el bloqueo de la ruta de señalización de insulina, y mediante la modulación de la homeostasis glucídica a través de la AKT y de la AMPK.

1.2. Efecto de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos sobre el estrés oxidativo en las células NRK-52E.

El estrés oxidativo juega un papel importante en la etiología de la DN²¹⁶, y también en la disfunción tubular; esta última alteración se relaciona con la disminución de la función renal en estadios iniciales de esta patología^{170,216}. Por tanto, la protección de las células del túbulo proximal renal mediante la prevención de la activación de vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo es una estrategia interesante para retrasar el desarrollo y el progreso de la DN. Así pues, los flavonoides por su conocida actividad antioxidante y, por su menos caracterizada acción antidiabética, pueden ser buenos candidatos para la prevención del daño oxidativo en la DN.

Como se ha mencionado anteriormente, los efectos de los flavanoles, entre los que se encuentra la EC, dependen de su biodisponibilidad^{171–173,217}. Así, para evaluar el impacto de los compuestos fenólicos sobre la salud, se deben tener en cuenta también los ácidos fenólicos derivados del metabolismo de los polifenoles^{171,172,217,218}. En este sentido se ha de mencionar que los principales ácidos fenólicos derivados de la ingesta de flavanoles que se encuentran en orina son el HPPA, el DHPA y el DHBA¹⁷². Por tanto, en este estudio, se ha evaluado el efecto protector de estos compuestos sobre el estado redox de las células del túbulo proximal renal tratadas con una concentración alta de glucosa. Como en la sección anteriores, se han seleccionado las mismas concentraciones de EC y de los tres ácidos fenólicos más abundantes derivados de la ingesta de alimentos ricos en flavanoles por ser similares a las que se encuentran en los fluidos biológicos después de la ingesta de flavanoles¹⁷².

El estrés oxidativo en la diabetes es una consecuencia de los altos niveles de glucosa y parece contribuir a la aparición de las complicaciones diabéticas²¹⁶. Así, las altas concentraciones de glucosa provocaron un aumento en la generación de los ROS, así como una disminución de los niveles del GSH y de las actividades de la GPx, la GR, la SOD y la CAT en las células NRK-52E, de manera análoga a lo que se ha descrito en otros modelos de DN *in vitro* e *in vivo*^{179,219,220}. Sin embargo, el pretratamiento de las células con la EC y con el DHPAA previno el desequilibrio del estado redox causado por una alta concentración de glucosa, ya que protegió del aumento de los niveles de los

ROS, así como de la disminución del contenido del GSH y de las actividades enzimáticas de la GPx, la GR, la SOD y la CAT. De acuerdo con nuestros resultados, otros compuestos naturales como las infusiones de menta, el ácido glicirrónico y la β -casomorfina-7 atenuaron la alteración del estado redox en el riñón de animales diabéticos y en células renales en cultivo tratadas con altas dosis de glucosa^{179,220,221}. Del mismo modo, la EC y la aponicina (inhibidor de la NOX) previnieron el desequilibrio redox en el riñón de diferentes modelos de animales diabéticos^{193,219}. Además, la EC y el DHPAA evitaron la oxidación de las proteínas causada por la sobreproducción de los ROS en los tejidos sensibles a la insulina^{218,222}, y la EC fue capaz de eliminar el O_2^- y el $\cdot OH$ *in vitro*²²³. Todos estos resultados sugieren que el efecto beneficioso de los flavanoles podría venir dado por su capacidad para modular la generación de los ROS y para reforzar la actividad de las enzimas antioxidantes en situaciones de estrés, lo que conduce a una minimización del daño oxidativo^{193,219,222,224}.

El estrés oxidativo generado por la hiperglucemia también activa a las proteínas claves de las rutas relacionadas con el estrés, como son las MAPKs, que juegan un papel importante en la patogénesis de la DN¹⁷⁰. En este estudio, el tratamiento de las células NRK-52E con una alta concentración de glucosa provocó un aumento de los niveles fosforilados de las MAPKs. Sin embargo, este incremento de los niveles fosforilados de las MAPKs se previno cuando las células se pretrataron con la EC o con el DHPAA. De manera similar, el pretratamiento de las células del túbulo proximal renal con un dímero de la EC (procianidina B2) disminuyó la activación de la proteína p38 en comparación con las células tratadas con una concentración alta de glucosa (60 mM durante 48 horas), mostrando un efecto antifibrótico²²⁵. Además, otros compuestos fenólicos como la apigenina, un derivado de la curcumina y la EGCG fueron capaces de ejercer efectos antidiabéticos a través de la disminución de los niveles fosforilados de las MAPKs en las células renales *in vitro* e *in vivo*^{177,226–228}.

Recientemente se ha sugerido que la NOX-4 podría contribuir al inicio y desarrollo del daño renal en la DN, de tal forma que la inhibición de esta proteína atenúa la lesión provocada en los túbulos renales^{216,229,230}. En este sentido, el pretratamiento con la EC y con el DHPAA previno el aumento de los niveles de expresión de la NOX-4 en las células tratadas con la alta concentración de glucosa, contribuyendo a mantener el equilibrio redox. Además, la inhibición de la NOX-4 en las células pretratadas con la EC y con el DHPAA impidió la sobreproducción de los ROS, así como la disminución de la actividad de la SOD y los niveles de la SIRT-1. De la misma manera, investigaciones previas realizadas con un cacao enriquecido en flavanoles, así como con naringenina y antioxidantes o con inhibidores de la NOX-4 (el DPI y la plumbagina) han mostrado un efecto renoprotector, que se tradujo en una

mejora de la funcionalidad de las células tubulares renales *in vitro* e *in vivo*^{229,231–234}. También otros estudios han demostrado que en la DN las células del túbulo proximal presentan niveles elevados de la NOX-4 y un descenso de la actividad de la SOD; sin embargo, cuando se inhibía la NOX-4 se aumentaba la actividad de la SOD y se reducían los niveles de marcadores del estrés oxidativo^{233,235}. Por tanto, se sugiere que la EC y el DHPAA podrían tener un papel clave en la prevención del daño de las células tubulares proximales renales tratadas con altas dosis de glucosa mediante la inhibición de la NOX-4.

La activación de la SIRT-1 contribuye a aumentar la resistencia de las células tubulares a desarrollar un estrés metabólico y oxidativo²³⁶. De hecho, el uso terapéutico de las sirtuinas se encuentra actualmente en fase de ensayos clínicos, ya que es probable que mejoren la situación diabética en humanos²³⁶. En este sentido, se ha descrito que los niveles de la SIRT-1 se reducen en los pacientes diabéticos, y en las células tubulares renales tratadas con altas dosis de glucosa^{179,236}. Sin embargo, la EC y el DHPAA aumentaron los niveles de la SIRT-1 en las células NRK-52E, como han demostrado otros investigadores que utilizaron flavonoides como la puerarina y el resveratrol en células renales cultivadas, o con el cacao y la EC en el tejido adiposo de ratas^{237–239}. Por otro lado, el pretratamiento con la EC y el DHPAA impidió la disminución de los niveles de la SIRT-1 en las células NRK-52E tratadas con una concentración alta de glucosa. De acuerdo con estos resultados, la procianidina B2 de la semilla de uva, el ácido glicirricínico y la puerarina evitaron la disminución de los niveles de la SIRT-1 en células renales tratadas con altas dosis de glucosa, lo que se asoció con un efecto protector y una mejora del equilibrio redox en estas células^{179,238,240}. Además, la inhibición de la SIRT-1 anuló los efectos protectores ejercidos por la EC y por el DHPAA en las células tratadas con altas dosis de glucosa, ya que se aumentó la generación de los ROS y los niveles de la NOX-4, y se disminuyó la actividad de la SOD. Todas estas consideraciones sugieren que la SIRT-1 regula a las proteínas moduladoras del estado redox^{179,238}. También, en los podocitos, el tratamiento con puerarina protegió a las células del estrés oxidativo mediante la activación de la SIRT-1 y, por tanto, mediante la disminución de los niveles de la NOX-4²³⁸.

A modo de resumen, en este estudio se ha demostrado por primera vez que la EC y el metabolito colónico DHPAA previenen del desequilibrio en el estado redox de las células tratadas con una alta concentración de glucosa. La EC y el DHPAA fueron capaces de reducir la producción excesiva de los ROS, restaurar los niveles de actividad de las defensas antioxidantes, y modular las vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo (las MAPKs, la SIRT-1 y la NOX-4).

1.3. Efecto de una dieta rica en cacao sobre la modulación de la homeostasis glucídica en ratas diabéticas ZDF.

La prevención y el tratamiento de la DN se fundamenta en regular y restaurar los numerosos factores que subyacen a esta patología, siendo la glucotoxicidad un factor importante en este proceso^{170,241,242}. Por ello, la actividad antidiabética del cacao podría hacer de este alimento una herramienta eficaz para controlar los niveles de glucosa^{170,222,237,243–246}. Sin embargo, en la actualidad, las investigaciones moleculares son insuficientes para apoyar esta idea, especialmente en el riñón, que ha demostrado ser un órgano clave para el mantenimiento de la homeostasis glucídica^{180,181,247}.

En las etapas tempranas de la enfermedad diabética aparece una hiperglucemia crónica acompañada de hiperinsulinemia^{171,215,248}. Sin embargo, en este estudio se ha demostrado que ambos parámetros se atenuaban en aquellas ratas diabéticas que habían sido alimentadas con una dieta rica en cacao respecto a las ratas diabéticas que recibieron la dieta control. De manera similar, se ha descrito que el cacao mejora el metabolismo glucídico en diferentes modelos de roedores diabéticos mediante la modulación de elementos relacionados con la homeostasis glucídica y la sensibilidad a la insulina^{215,245,246}. El modelo animal diabético que se ha utilizado en este estudio, las ratas ZDF, padece obesidad, y predisposición a desarrollar T2D y todas sus complicaciones, como la DN. De esta manera, la ingesta de alimento en estos animales ZDF fue superior a la del grupo ZL, lo que resultó indicativo de su estado hiperfágico^{195,248}.

Sin embargo, la dieta rica en cacao disminuyó el peso corporal de las ratas diabéticas a pesar de que la ingesta total fue similar en ambos grupos (ZDF-C y ZDF-Co). Este efecto se ha relacionado con la fracción polifenólica del cacao y su capacidad para reducir la grasa del tejido adiposo^{195,245,246}. Por otro lado, el peso absoluto de los riñones aumentó en los animales diabéticos, mientras que la relación entre el peso del riñón y el peso del cuerpo se mantuvo igual en los tres grupos de ratas, lo que sugiere que estos animales se encuentran en un estadio inicial de la DN^{249,250}.

La fisiopatología de la diabetes se caracteriza por la presencia de hiperglucemia, de hiperinsulinemia, de intolerancia a la glucosa, de resistencia a la insulina, así como por un aumento de los niveles de la HbA1c y una menor sensibilidad a la insulina^{195,251}. Los resultados de este estudio han mostrado que la ingesta de una dieta rica en cacao protegió a los animales diabéticos frente a todas las alteraciones metabólicas antes mencionadas, lo que sugiere que el cacao mejoró la homeostasis glucídica. De manera similar, distintas investigaciones han descrito una mejoría de la fisiopatología de la DN en roedores diabéticos alimentados con cacao o extractos de cacao^{187,195,245,246,252}. Además, durante la diabetes generalmente se producen cambios en la

estructura y la función renal que se han relacionado principalmente con la glucotoxicidad^{170,241}; así, en estadios iniciales de la DN, el riñón presenta hipertrofia e hiperfiltración¹⁷⁰. Por lo tanto, este incremento en el eGFR explica los altos niveles de la creatinina sérica, y de la albúmina y de la glucosa en la orina en las ratas diabéticas. Por otra parte, estas alteraciones funcionales se acompañan de cambios morfológicos en la corteza renal, como la hipertrofia glomerular, la expansión del mesangio y del espacio de Bowman, así como la hipertrofia tubular (aumento del espesor del epitelio tubular), la acumulación de estructuras hialinas y la dilatación de los túbulos. De hecho, todos estos cambios morfológicos se han asociado con un aumento del peso del riñón, y con el incremento de la creatinina sérica²⁵³. Así, el grado de proteinuria mostrado por las ratas diabéticas se relaciona con la formación de estructuras hialinas dentro de la luz tubular y refleja el aumento de la reabsorción proteica¹⁷⁰. También se ha descrito que esta hiperfiltración relacionada con la lesión glomerular es secundaria al aumento exacerbado de la reabsorción de glucosa en los túbulos proximales²⁵⁴, y que debido al crecimiento del túbulo, se reabsorbe más filtrado, lo que conduce al incremento del eGFR¹⁷⁰. En este sentido, la funcionalidad compensatoria y la hipertrofia estructural en los glomérulos y túbulos de los animales ZDF-C se deben a un intento por mantener un rango normal de filtración y reabsorción en las etapas tempranas de la diabetes. Sin embargo, todas estas alteraciones estructurales y funcionales, que estuvieron presentes en las ratas ZDF-C, se revertieron en las ratas diabéticas alimentadas con una dieta rica en cacao. Estos resultados se ven apoyados por distintas investigaciones que mostraron como la administración de cacao en ratas hipertensas y diabéticas contribuyó a prevenir la expansión mesangial del glomérulo²³¹. De manera similar, el té verde y un extracto de semillas de uva protegieron de las alteraciones estructurales y funcionales en el riñón de distintos modelos de roedores diabéticos^{176,205,220,242,255}. Todos estos resultados apoyan el hecho de que la mayoría de las alteraciones renales pueden revertirse en estadios tempranos de la DN mediante un buen control de la glucemia²⁴².

Las células del túbulo proximal de los riñones desempeñan un papel crucial en la homeostasis glucídica y la alteración de su funcionalidad constituye una de las primeras manifestaciones fisiopatológicas de la DN^{170,182}, como se ha mencionado antes. Además, se ha de considerar que la hiperglucemia altera vías metabólicas celulares como la gluconeogénesis, la captación de glucosa o la vía de la insulina^{180,183,190}. Así, la hiperglucemia modificó la señalización de la insulina en las ratas diabéticas ZDF-C, ya que presentaron una disminución de los niveles fosforilados en los residuos de tirosina del IR, como se ha mostrado en otras investigaciones²⁴⁷. No obstante, la alimentación de los animales diabéticos con la dieta rica en cacao previno esta alteración. Del mismo modo, otros flavonoides como la quercetina, la rutina y la EC aliviaron la resistencia a

la insulina mediante el aumento en riñón de los niveles fosforilados de los residuos de tirosina del IR en ratas alimentadas con fructosa²⁰⁰.

En relación con la ruta de señalización de la insulina, en este trabajo se ha demostrado que el córtex renal de las ratas diabéticas presentó una inactivación de la GSK3 y una activación de la GS, lo que provocó un aumento del contenido del glucógeno, al igual que se ha descrito en las ratas ZDF en otros órganos con capacidad de llevar a cabo la glucogenogénesis, como el hígado^{195,248}. Sin embargo, estos efectos fueron revertidos cuando los animales fueron alimentados con la dieta rica en cacao. En línea con estos resultados, se ha demostrado que la administración de un extracto de semillas de uva en ratones diabéticos restauró la activación de la GSK3, lo que se asoció con un efecto protector en la DN²⁵⁶. De igual manera, la administración de té verde fue capaz de evitar la acumulación de glucógeno en los túbulos renales de ratas diabéticas²⁰⁵. Todos estos resultados parecen indicar que el cacao podría mejorar la resistencia a la insulina y contribuir a la homeostasis glucídica mediante la activación de la GSK3 y la disminución del contenido de glucógeno en la corteza renal de las ratas diabéticas.

La gluconeogénesis renal se produce principalmente en la corteza y representa un mecanismo crucial para la regulación de la homeostasis glucídica¹⁸⁰. De hecho, en la corteza renal de las ratas y los pacientes diabéticos se han encontrado niveles elevados de las enzimas gluconeogénicas PEPCK y G-6-Pasa^{181,257,258}. En este estudio, la ingesta de la dieta rica en cacao en las ratas diabéticas protegió del aumento de las enzimas comentadas anteriormente y, por ello, se inhibió la gluconeogénesis renal y se mejoró la glucemia. De manera análoga, la administración de la nuez de areca, del cinamaldehído y del vanadio a animales diabéticos inhibió la gluconeogénesis renal^{191,192,259,260}. También, se ha sugerido que la alteración de la señalización del IR en ratas resistentes a la insulina podría contribuir a mantener unos niveles elevados de glucemia por la activación de la gluconeogénesis¹⁸¹. Así pues, a la luz de todos estos resultados parece que el cacao podría contribuir a disminuir los niveles de glucemia en las ratas diabéticas mediante la restauración de los niveles de la PEPCK y de la G-6-Pasa, jugando un papel importante en este proceso la señalización de la insulina en la corteza renal.

En la corteza renal afectada por la DN, la glucosa reabsorbida por el SGLT-2 retorna a la circulación a través del GLUT-2, lo que provoca un aumento de ambos transportadores en las etapas tempranas de la enfermedad y, con ello, un aumento de la glucotoxicidad y de la resistencia a la insulina^{180,261}. Estas alteraciones en la reabsorción de la glucosa conducen a la acumulación de glucógeno en los túbulos renales^{180,205}. Además, el aumento de los niveles de la albúmina se asocia con un incremento de la expresión del SGLT-2 en la diabetes¹⁸⁰. En las ratas ZDF-C se produjo un aumento de los niveles del

SGLT-2 y del GLUT-2 en la corteza renal, sin embargo, este efecto no se observó cuando las ratas diabéticas se alimentaron con una dieta rica en cacao. De manera similar, la florizina y el resveratrol contribuyeron a restaurar los niveles de ambos transportadores en roedores diabéticos^{262,263}. Además, la disminución de la reabsorción de glucosa en los túbulos proximales como consecuencia del descenso de los niveles del SGLT-2 en las ratas diabéticas alimentadas con cacao podría restaurar el mecanismo de circulación entre el túbulo y los glomérulos y, así, contribuir a reducir la hiperfiltración glomerular, y también a atenuar la hipertrofia renal. Así pues, el cacao podría mejorar la homeostasis glucídica y la sensibilidad a la insulina mediante la modulación de la expresión del SGLT-2 y del GLUT-2 en las ratas diabéticas.

Se ha de mencionar también que aunque el cacao contiene fibra, sus efectos beneficiosos sobre la salud se han relacionado principalmente con sus flavanoles. No obstante, se ha demostrado recientemente que los efectos beneficiosos atribuidos al cacao no solo se deben a la fibra, si no que sus polifenoles y otros compuestos podrían también tener un papel clave²⁶⁴. Así, la EC y las procianidinas parecen contribuir al mantenimiento de la función y la estructura renal durante la diabetes^{240,265,266}. También la teobromina parece proteger de la cristalización del ácido úrico²⁶⁷ y, en combinación con los flavanoles del cacao, aumenta el efecto protector vascular²⁶⁸, aspecto que ayuda a preservar los riñones.

Finalmente, se ha de considerar que la cantidad de cacao empleada en este estudio en los animales es equivalente a una dosis diaria de 64,5 g de cacao, que contiene 1075 mg de polifenoles, para un humano de 60 Kg. Aunque esta ingesta de compuestos fenólicos se puede considerar como realista, la cantidad de cacao necesario para obtenerla es superior a la ingesta diaria recomendada. De esta manera, se han hecho ensayos de intervención en humanos con chocolate negro enriquecido en polifenoles, llegando a alcanzar cifras de 1000 mg de polifenoles en 20 g de chocolate²⁵⁵, lo que representa entre un 5 y un 10% de las calorías diarias recomendadas. Esta cantidad podría integrarse fácilmente en la dieta, si bien se necesitan más investigaciones en las que se disminuya la dosis de cacao para que la relevancia fisiológica de los estudios sea aún mayor y se pueda llegar a conocer la concentración necesaria para conseguir los efectos beneficiosos en la salud.

En resumen, en este estudio se ha demostrado que una dieta rica en cacao mejora el control glucémico y la sensibilidad a la insulina en la corteza renal de las ratas ZDF. La dieta rica en cacao es capaz de proteger de la disminución de los niveles fosforilados en los residuos de tirosina del IR, de la inhibición de la vía de la GSK3/GS y del aumento de los niveles de expresión de los transportadores SGLT-2 y GLUT-2 en la corteza renal de las ratas diabéticas. Además, el cacao revierte los elevados niveles de la PEPCK y de la G-6-Pasa

de las ratas diabéticas, protegiendo la función renal mediante la restauración del contenido de glucógeno, de la morfología y la funcionalidad renales.

1.4. Efecto de una dieta rica en cacao sobre el estrés oxidativo, la apoptosis y la autofagia en ratas diabéticas ZDF.

El estrés oxidativo es un factor importante en el desarrollo y progreso de la DN²¹⁶. Por ello, las nuevas estrategias para abordar la enfermedad pasan por encontrar compuestos que pongan en marcha mecanismos para disminuir o inhibir las fuentes de producción de los ROS, para mejorar las defensas antioxidantes y para modular aquellos procesos relacionados con el estrés, como la apoptosis o la autofagia. En este sentido, el cacao puede ejercer efectos relevantes, ya que ha demostrado tener actividad antioxidant y antidiabética^{171,245,269}.

El estadio inicial de la DN se caracteriza por una hipertrofia e hiperfunción renal¹⁷⁰. De hecho, esta última se relaciona con la hiperfiltración, lo que explica los elevados niveles séricos del ácido úrico, y de la creatinina y la albumina presentes en la orina de las ratas diabéticas. Sin embargo, la alimentación de las ratas diabéticas con una dieta rica en cacao previno el aumento de estos parámetros. Del mismo modo, los alimentos ricos en flavanoles, como el cacao y el té verde, o los flavanoles puros, como la EGCG y la procianidina B2, protegieron a los riñones de las alteraciones funcionales en diferentes modelos de diabetes en roedores^{205,256,270}.

En la DN se activan varias rutas de señalización y, entre ellas, las relacionadas con el estrés oxidativo^{170,271,272}. En este trabajo, en la corteza renal de las ratas ZDF-C se produjo un aumento de los niveles de producción de los ROS y del contenido de grupos carbonilos, aunque estos efectos se atenuaron cuando los animales recibieron la dieta rica en cacao. También se ha visto que el incremento de los valores de la NOX-4, que se detectaba en las ratas diabéticas, no se producía cuando estas ingerían una dieta rica en cacao. Este exacerbado estrés oxidativo observado en las ratas diabéticas condujo a alteraciones en el sistema de las defensas antioxidantes, ya que se redujeron las actividades de las enzimas SOD y CAT, así como los niveles fosforilados del Nrf2. No obstante, la respuesta antioxidante se restauró en las ratas alimentadas con el cacao. Estos resultados se ven apoyados por distintas investigaciones que mostraron un descenso de los niveles del GSH, así como una disminución de las actividades enzimáticas de la GPx, de la GR, de la SOD y de la CAT en el riñón de diversos modelos experimentales en animales diabéticos^{23,260,273}. Además, un cacao enriquecido en flavanoles y un extracto de distintos flavanoles suprimieron el estrés oxidativo al disminuir la generación de los ROS, el contenido de grupos carbonilos y los niveles de la NOX-4, así

como al aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y SOD en una situación de diabetes^{228,231,240,265,270,273,274}. De hecho, a la NOX-4 se le ha atribuido un papel importante en el desarrollo del estrés oxidativo, de manera que su inhibición incrementó la actividad de la SOD, lo que disminuyó el estrés oxidativo y mejoró la función renal²³⁵.

Como se ha mencionado anteriormente, el estrés oxidativo activa diferentes vías de señalización, entre las que se encuentra también la ruta de las MAPKs²⁷¹. Así, en las ratas diabéticas, se ha mostrado un aumento de los niveles fosforilados de las ERKs^{228,256,275}. De manera similar, la administración de las antocianinas, de las procianidinas o del EGCG a ratas diabéticas previno el incremento de los niveles fosforilados de las ERKs, y redujo el estrés oxidativo^{228,256,275}.

La AMPK, la SIRT-1 y el mTOR son proteínas que están reguladas por el estrés oxidativo y metabólico^{236,276}. Durante la DN se produce una disminución de los niveles de la AMPK y de la SIRT-1, así como un aumento de los del mTOR^{231,266,273,274}. En este estudio, en las ratas diabéticas se ha observado un descenso de los niveles fosforilados de la AMPK, que podría estar asociado a la activación de la NOX-4 y a la disminución de los niveles de la SIRT-1, así como a la disminución de las actividades de la CAT y de la SOD. Estos resultados se ven apoyados por distintas investigaciones que asocian ese descenso de los niveles fosforilados de la AMPK con la albuminuria y con la disfunción renal en los animales diabéticos^{179,231}. Sin embargo, la dieta rica en cacao recuperó completamente todos los parámetros mencionados anteriormente, al igual que ocurre en otros modelos experimentales de diabetes al administrar la EC o el cacao enriquecido en flavanoles^{231,240,266,273,274}. Además, la estimulación de la AMPK y de la SIRT-1 protegió del daño oxidativo al suprimir la activación de la NOX-4 y, por tanto, la generación de los ROS en las células renales²³⁶. La activación de las dos proteínas comentadas anteriormente también se ha relacionado con el incremento de los niveles fosforilados del Nrf2 en las complicaciones diabéticas²⁷⁷. En consecuencia, la activación de la señalización de la AMPK y de la SIRT-1 se ha relacionado con una mejora del estado redox y de la funcionalidad renal en los animales diabéticos^{273,277}.

En la DN, la alteración de la autofagia se asocia con una disminución de los niveles fosforilados de la AMPK, lo que conduce a la activación de la vía del mTOR y a la disminución de los niveles de la SIRT-1²⁷⁸, como se ha observado en las ratas diabéticas en este estudio. Es importante destacar que la autofagia desempeña un papel crucial en la patogénesis de la enfermedad renal diabética, ya que es un mecanismo esencial para mantener la homeostasis de los túbulos y glomérulos en la corteza renal²⁷⁸. Así, distintas investigaciones han descrito un aumento de los niveles de la p62 y, por tanto, una disminución de la autofagia en la corteza renal de animales y pacientes diabéticos^{279,280}. De

manera similar, este estudio ha mostrado un aumento de los niveles de la p62 y una disminución de los niveles de la Beclina-1 y de la relación LC3-II/LC3-I en las ratas diabéticas. Sin embargo, la dieta rica en cacao previno esta inhibición del proceso autofágico y el descenso de los niveles fosforilados y totales de la AMPK y de la SIRT-1, así como del aumento de los valores del mTOR. Estos resultados se ven apoyados por distintas investigaciones que demostraron que el tratamiento de los animales diabéticos con el resveratrol activó a la AMPK y a la SIRT-1 e inhibió al mTOR, lo que condujo a una estimulación de la autofagia y una atenuación del daño renal^{281,282}.

El estrés oxidativo y la alteración de la autofagia también están relacionados con la apoptosis; así, ambos procesos pueden contribuir a favorecer este tipo de muerte celular programada en el riñón durante la DN^{272,276}. El aumento de los niveles de las proteínas proapoptóticas (la Casp-3, la Casp-9 y el Bax) y el descenso de los niveles de las proteínas antiapoptóticas (el Bcl-x_L) en la corteza renal de las ratas diabéticas de este estudio se asoció con un aumento del índice apoptótico (el TUNEL) y del índice proliferativo (el PCNA). Estas alteraciones también se han descrito en las vías de señales de las células de los túbulos renales de los animales diabéticos^{270,283}. De hecho, un aumento de la proliferación en la corteza renal se ha relacionado con la hipertrofia tubular temprana y la hiperplasia, como consecuencia de la hiperfuncionalidad renal¹⁷⁰. Sin embargo, en las ratas diabéticas alimentadas con cacao, se previno la alteración de los procesos de autofagia y apoptosis. De manera similar, el fármaco antidiabético pioglitazona y el triterpenoide ácido betulínico ejercieron efectos antiapoptóticos y antiproliferativos en el riñón de las ratas diabéticas, lo que mitigó el daño renal^{273,283}. Además, el zumo enriquecido en quercetina, las procianidinas, el EGCG y las antocianinas también mostraron efectos beneficiosos al paliar el daño renal por inhibir la apoptosis (disminuyeron los niveles de la Casp-3) en los animales diabéticos y en cultivos de células^{266,270,275,284}. Del mismo modo, podría destacarse que la recuperación de los niveles de la SIRT-1 y de la AMPK por los tratamientos con las procianidinas en modelos diabéticos no solo se han relacionado con una inhibición del estrés oxidativo, sino también con una supresión de la apoptosis que condujo a una reducción del daño renal^{266,274}.

En resumen, en este estudio se ha demostrado que una dieta rica en cacao mejora la funcionalidad de los riñones al ejercer efectos renoprotectores que contribuyen al mantenimiento del equilibrio redox y la homeostasis celular a través de la activación de la autofagia y la inhibición de la apoptosis en la corteza renal de las ratas ZDF. La dieta rica en cacao previene el aumento de la generación de los ROS, así como la oxidación de las proteínas y el incremento de los niveles de la NOX-4 en los animales diabéticos. Además, el cacao modula las defensas antioxidantes renales (el p-Nrf2, la SOD y la CAT),

Discusión integradora – Capítulo primero

y proteínas clave relacionadas con el estrés oxidativo (las p-ERKs) y la citoprotección (la AMPK, el mTOR y la SIRT-1). También, el cacao contribuye a aliviar la lesión renal a través de la regulación de los procesos de autofagia y apoptosis en la corteza renal de las ratas ZDF.

2. Capítulo segundo - Efecto de los flavanoles del cacao sobre las alteraciones de la funcionalidad y el daño oxidativo vascular en modelos de experimentación.

2.1. Efecto de los ácidos fenólicos derivados de la ingesta de cacao sobre la disfunción endotelial inducida por el estrés oxidativo en las células EA.hy926.

Más del 80% de los flavanoles ingeridos en la dieta son metabolizados por la microbiota colónica, generando ácidos fenólicos con capacidad para contribuir a las actividades biológicas de los flavanoles¹⁷². De hecho, estos metabolitos colónicos son considerados actualmente unos de los principales responsables de sus propiedades saludables. Sin embargo, hasta el momento se desconocen muchos de los efectos biológicos de estos compuestos. En este sentido, después del consumo regular de alimentos ricos en flavanoles (principalmente el cacao y sus derivados) se pueden encontrar en plasma y orina ácidos fenólicos como el HPPA, el DHPAA y el DHBA, así como sus formas conjugadas²⁸⁵. Por ello, en este estudio se ha evaluado el posible efecto beneficioso de algunos de estos ácidos fenólicos (el DHPAA, el DHBA y el HPPA) sobre la función endotelial. El tratamiento *in vitro* con estos metabolitos es más adecuado ya que refleja con mayor precisión las condiciones fisiológicas que aparecen en el plasma tras el consumo de compuestos puros como las procianidinas¹⁷². Además, en este estudio se han utilizado dosis realistas de los ácidos fenólicos, entre 1 y 10 μM , que son las concentraciones que se han encontrado en las distintas investigaciones tras la ingesta de alimentos ricos en flavanoles^{285,286}.

Las células endoteliales juegan un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis vascular al liberar diversos factores vasodilatadores, siendo el más importante el NO. En este estudio se ha demostrado que el tratamiento de las células EA.hy926 con concentraciones de 10 μM de los ácidos fenólicos aumentaba la producción del NO. Más importante, la mezcla de los tres metabolitos en concentraciones más bajas (4 μM del DHPAA + 4 μM del DHBA + 4 μM del HPPA) también fue capaz de aumentar la producción del NO en dichas células. Estos resultados están de acuerdo con otros estudios que muestran que el tratamiento *in vitro* con una mezcla de metabolitos derivados de los elagitaninos aumentaba la producción del NO de manera más eficaz que los metabolitos de manera individual²⁸⁷. Todo ello apoyaría la hipótesis de que el efecto beneficioso de las dietas ricas en flavanoles se debe a la actividad biológica sinérgica de los metabolitos circulantes²⁸⁸.

El cacao y sus flavanoles han demostrado ser capaces de mejorar la función endotelial, reduciendo así el riesgo de mortalidad cardiovascular²⁸⁹. Este efecto beneficioso ha sido atribuido en gran parte a la EC, un flavanol abundante del cacao, que ha demostrado inducir la relajación endotelial en

Discusión integradora – Capítulo segundo

animales y humanos²⁹⁰. Más concretamente, se ha descrito que la EC es capaz de fosforilar y activar la enzima clave de la síntesis del NO, la eNOS, a través de la vía de la PI3K/AKT y de la quinasa dependiente de calmodulina, provocando un aumento de la producción del NO en las células endoteliales de la arteria coronaria humana²⁹¹. También, la EC es capaz de inducir la fosforilación de la eNOS a través de la formación de un complejo activo entre la eNOS, la AKT y la *proteína de choque térmico 90* (HSP90, de sus siglas en inglés Heat Shock Protein 90)²⁹². Sin embargo, esta es la primera vez que se demuestra que el tratamiento de células endoteliales con una mezcla de metabolitos colónicos derivados de los flavanoles del cacao, aumenta los niveles fosforilados de los residuos de serina de la eNOS y, con ello, la producción del NO.

Estos resultados coinciden con distintas investigaciones que indican que algunos metabolitos colónicos son capaces de provocar vasodilatación en los anillos aórticos aislados de rata²⁹³. Igualmente, el tratamiento de células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) con ácidos fenólicos derivados de la ingesta de las antocianinas indujo la activación de la hemo oxigenasa 1 y la modulación de la actividad de la eNOS, provocando un descenso de la producción de superóxido, y en consecuencia un incremento de la producción del NO²⁹⁴. Más recientemente, se ha demostrado que un metabolito colónico derivado de las proantocianidinas fue capaz de disminuir la adhesión endotelial de los monocitos THP-1 a las células endoteliales HUVEC²⁹⁵. Todos estos resultados parecen sugerir que los ácidos fenólicos pueden mejorar la función vascular y que probablemente sean uno de los principales compuestos activos capaces de provocar los efectos beneficiosos de los flavanoles.

Numerosas investigaciones han demostrado que la vía de la PI3K/AKT y de la AMPK desempeñan un papel importante en la modulación de la fosforilación de la eNOS²⁹⁶. Se ha visto que la AKT es capaz de fosforilar el residuo de serina y activar a la eNOS, por lo que es un regulador importante de la producción del NO endotelial²⁹⁷. Por otro lado, se ha comprobado que la AMPK también es capaz de fosforilar los residuos de serina y de esta forma activar a la eNOS en las células endoteliales²⁹⁸. De acuerdo con todo ello, en este estudio hemos demostrado que la mezcla de ácidos fenólicos es capaz de aumentar la fosforilación de la AKT y de la AMPK en células endoteliales en cultivo. Además, el tratamiento de las células con inhibidores específicos de estas proteínas disminuyó los niveles fosforilados de la eNOS y la producción del NO en respuesta a los ácidos fenólicos, lo que sugiere que el efecto de los metabolitos colónicos sobre la eNOS podría estar mediado en parte por la activación de la PI3K/AKT y de la AMPK. Estos resultados se ven apoyados por distintas investigaciones que muestran mecanismos similares de fosforilación de la eNOS en respuesta a diferentes compuestos fenólicos como la

genisteína²⁹⁹, la EGCG³⁰⁰, la hesperidina³⁰¹, la EC²⁹², la quercetina³⁰² o el resveratrol²³⁷, así como en respuesta a varios compuestos fitoquímicos²⁹⁰. La identificación de los metabolitos colónicos derivados de la ingesta de los polifenoles de la dieta que pueden influir en la producción del NO endotelial y la caracterización de su mecanismo de acción apoya aún más el efecto cardioprotector de estos compuestos naturales.

Es interesante destacar que los compuestos antioxidantes naturales no solo puede influir positivamente en la producción del NO endotelial sino que también pueden disminuir el estrés oxidativo y, de esta forma, favorecer igualmente la función endotelial³⁰³. En este sentido, se ha demostrado recientemente que algunos ácidos fenólicos producidos por la microbiota colónica podrían poseer efectos antioxidantes^{218,304,305}. Por lo tanto, en este estudio también se ha evaluado el posible efecto protector de estos metabolitos colónicos frente a un estrés oxidativo inducido por el tratamiento con *t*-BOOH, un prooxidante comúnmente utilizado para estudiar las alteraciones provocadas por los ROS en varios tipos celulares^{306,307,308}. Como era de esperar, el tratamiento con *t*-BOOH aumentó la generación de los ROS y el daño oxidativo celular, lo que resultó en una reducción de la viabilidad celular en las células EA.hy926. Asimismo, este tratamiento también provocó la activación de las vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo (las ERKs y las JNKs) y la disminución de los niveles fosforilados de la eNOS. Sin embargo, todos estos efectos se atenuaron cuando las células fueron pretratadas con los metabolitos colónicos, lo que sugiere que los ácidos fenólicos pueden prevenir la generación de los ROS y la activación de las vías relacionadas con el estrés oxidativo y, por ello, la disfunción endotelial. Resultados similares se han mostrado recientemente con el HPPA que previno el aumento en la producción de los ROS provocado por altas dosis de glucosa, manteniendo la fosforilación de la eNOS dependiente de insulina y la producción del NO³⁰⁹. Sin embargo, no podemos descartar que la capacidad de estos metabolitos de activar a la eNOS a través de las vías de la AKT y de la AMPK también pueda contribuir a proteger a las células endoteliales de la disfunción endotelial asociada al estrés oxidativo. Por lo tanto, los efectos protectores de estos compuestos podrían depender tanto de su modulación sobre el estado oxidativo como de su activación directa de la AKT, de la AMPK y, finalmente de la eNOS.

Todos estos resultados en conjunto sugieren que los metabolitos colónicos de los flavanoles pueden evitar la disfunción endotelial asociada con el estrés oxidativo, lo que indica que sus efectos beneficiosos sobre el sistema vascular pueden estar parcialmente mediados por sus propiedades antioxidantes.

En definitiva, en este estudio, se ha demostrado por primera vez que los ácidos fenólicos derivados del metabolismo microbiano tras la ingesta de flavanoles pueden inducir la producción *in vitro* del NO en células endoteliales humanas. Del mismo modo, se ha mostrado que este efecto esta mediado por

las vías de señalización de la AMPK y de la PI3K/AKT, así como por la fosforilación/activación de la eNOS. Además, estos metabolitos colónicos también fueron capaces de proteger frente a situaciones de estrés oxidativo al prevenir el aumento en la generación de los ROS y la activación de las vías de señales relacionadas con el estrés, evitando de esta forma la disfunción endotelial y la muerte celular. Todos estos resultados proporcionan nuevas evidencias de que el beneficio de los flavanoles del cacao sobre la función endotelial podría resultar, al menos en parte, por la bioactividad de sus metabolitos colónicos.

2.2. Efecto de una dieta rica en cacao sobre la rigidez, el remodelado aórtico y el estrés oxidativo en ratas diabéticas ZDF.

Una vez evaluado el potencial efecto protector de los flavanoles del cacao y sus metabolitos colónicos *in vitro*, nos planteamos comprobar si este efecto beneficioso podría aparecer también en una situación de daño vascular *in vivo*. Una de estas situaciones de alto riesgo cardiovascular es la T2D en la que aparecen serias complicaciones macrovasculares asociadas a cambios funcionales y estructurales de la pared vascular que resultan finalmente en la rigidez arterial temprana y la remodelación vascular³¹⁰. Así pues, empleando el mismo modelo animal de diabetes, las ratas ZDF, nos propusimos comprobar si la ingesta de cacao podría prevenir las alteraciones hemodinámicas, la rigidez arterial y la remodelación vascular que se producen durante la diabetes y el mecanismo involucrado. Este modelo animal presenta daño arterial durante la progresión de la enfermedad, lo que hace que sea altamente apropiado para evaluar el efecto del cacao sobre la función vascular en la T2D.

Una gran mayoría de pacientes con T2D presentan numerosas alteraciones hemodinámicas y rigidez arterial³¹¹ que se asocia con un alto riesgo de padecer cardiopatías³¹². De acuerdo con esto, los animales diabéticos presentaron un aumento de la sSAP, de la dSAP, de la mSAP, así como una disminución de la frecuencia cardíaca. Igualmente, el PP y el *índice de aumento* (AI de sus siglas en inglés Augmentation Index), ambos parámetros indicadores de rigidez arterial, fueron significativamente superiores en los animales ZDF-C. Sin embargo, todos estos efectos se vieron atenuados cuando los animales diabéticos fueron alimentados con una dieta rica en cacao. Este efecto cardioprotector del cacao también se ha observado en modelos experimentales de riesgo cardiovascular³¹³ como la hipertensión, y apoya los resultados observados en varios estudios de intervención que sugieren que el cacao puede también tener potencial terapéutico para prevenir complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos¹⁶. Es importante mencionar que, a pesar de la presencia de la rigidez arterial, los animales diabéticos ZDF no mostraron disfunción endotelial. Como se ha descrito

previamente, una hiperglucemia moderada es suficiente para inducir cambios estructurales en el endotelio, pero es necesaria una hiperglucemia severa para provocar la disfunción endotelial³¹⁴.

El aumento de la rigidez arterial resulta en gran medida de alteraciones en la composición y en la estructura de la pared vascular. Varios mecanismos están involucrados en este proceso, incluido la hiperplasia de la túnica media y de la íntima, así como los cambios en la presencia de colágeno y elastina en la pared vascular³¹⁵. En este estudio se ha demostrado un aumento del espesor de la túnica media y de la relación de esta con el diámetro aórtico interno en las ratas diabéticas no suplementadas con cacao, lo que indica hiperplasia de la túnica e hipertrofia vascular de las células del músculo liso³¹⁵. Además, el contenido de elastina en las aortas de estos animales diabéticos disminuyó, mientras que la acumulación de colágeno aumentó, resultando en una reducción de la relación de la elastina con el colágeno, lo que se relaciona con el avance de la rigidez arterial³¹⁶. Sin embargo, todas estas alteraciones estructurales no se produjeron cuando las ratas diabéticas fueron alimentadas con una dieta rica en cacao, lo que apoya el efecto protector del cacao sobre la rigidez arterial comentado anteriormente. En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto el efecto beneficioso de la ingesta de cacao sobre los cambios estructurales vasculares y la remodelación que tiene lugar en los animales diabéticos. Es interesante destacar que, aunque son limitados los estudios de intervención en humanos que han evaluado el consumo de los productos de cacao en pacientes con T2D, en algunos de ellos se ha observado también este efecto protector del consumo de cacao sobre la función vascular¹⁶. Por tanto, es necesario realizar más ensayos clínicos en personas con diabetes para aclarar el potencial del cacao para reducir el riesgo de las complicaciones vasculares en estos pacientes.

El estrés oxidativo juega un papel fundamental en el desarrollo de la rigidez arterial y la remodelación vascular, apareciendo de manera constante en modelos experimentales y pacientes con diabetes^{317,318}. Existen varias fuentes productoras de los ROS en la pared vascular, incluyendo la familia de las NOXs, enzimas de la cadena respiratoria mitocondrial. En este sentido, se ha observado que en condiciones de hiperglucemia y de diabetes la producción de los ROS aumenta como consecuencia de la activación de las NOXs, especialmente mediante la NOX-1, la NOX-2 y la NOX-4³¹⁹. De acuerdo con esto, en este estudio se ha encontrado que las ratas diabéticas presentaban niveles elevados de la NOX-2 y de la NOX-4 y, con ello, valores incrementados de los ROS en las arterias. Sin embargo, cuando los animales diabéticos fueron alimentados con la dieta rica en cacao no se producía este efecto. Igualmente, la activación de las vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo, como son las ERKs y las JNKs, así como el daño oxidativo, se vió atenuado en las arterias de las ratas diabéticas suplementadas con cacao.

Discusión integradora – Capítulo segundo

La SIRT-1 es una proteína que ha sido implicada en la protección frente al estrés oxidativo por su capacidad para impedir la activación de las NOXs y, en consecuencia, disminuir la producción de los ROS. En particular, se ha descrito que la inhibición de la SIRT-1 aumenta la producción de los ROS y la expresión del ARNm de la NOX-4 en anillos aórticos³²⁰. En este sentido, las ratas diabéticas suplementadas con cacao fueron capaces de evitar la disminución de la SIRT-1 que presentaron los animales diabéticos control, contribuyendo probablemente de esta forma a evitar la activación de las NOXs en estos animales. Estos resultados están de acuerdo con los que se han mostrado previamente en las células renales NRK-52E, donde el pretratamiento de las mismas con la EC y con el DHPAA evitó la disminución de los niveles de la SIRT-1 y, por tanto, el aumento de los niveles de la NOX-4 inducidos por altas dosis de glucosa. Igualmente, se ha demostrado recientemente que la EC fue capaz de prevenir la disminución de los niveles de la SIRT-1 asociados al envejecimiento y revertir de este modo la función vascular tanto en modelos animales *in vivo* como en cultivos celulares *in vitro*³²¹.

En conjunto, estos resultados demuestran que la ingesta de cacao es capaz de proteger a los animales diabéticos del daño oxidativo arterial. Debido a que el cacao fue capaz de reducir los niveles de las NOXs y de los ROS así como el descenso de los niveles de la SIRT-1 inducido por la diabetes, se puede sugerir que este podría ser uno de los mecanismos que contribuyen a disminuir el daño oxidativo en las arterias de las ratas diabéticas. Este efecto antioxidante del cacao puede además explicar la mejora de la presión arterial, de la remodelación aórtica y de la sensibilidad a la insulina encontrada en estos animales diabéticos¹⁶⁶. Del mismo modo, los efectos antidiabéticos del cacao pueden producir una reducción de la hiperglucemia y mejorar la tolerancia a la glucosa, lo que también contribuiría a reducir el riesgo de daño vascular¹⁷¹.

La situación diabética no solo es capaz de aumentar la generación de los ROS, sino que también puede disminuir los niveles y la actividad de las defensas antioxidantes intracelulares en la pared arterial. De acuerdo con esto, en este estudio se ha encontrado que las arterias de las ratas diabéticas presentaban una disminución de los niveles nucleares del factor de transcripción p-Nrf2 que juega un papel fundamental en la regulación de la transcripción de un gran número de defensas antioxidantes³²². En consecuencia, la actividad de las enzimas antioxidantes GPx y GR, así como los niveles de la proteína metalotioneína se encontraron igualmente disminuidos en las arterias de las ratas diabéticas. Una vez más, todos estos efectos fueron totalmente prevenidos con la ingesta de cacao. La metalotioneína es una proteína antioxidante que se ha demostrado que es capaz de proteger contra las alteraciones vasculares y renales inducidas por la diabetes³²³. Además, la disminución de los niveles de esta proteína se ha asociado con daños en la arteria, incluidos la remodelación aórtica y el

aumento del estrés oxidativo³²³. Los resultados de este estudio están de acuerdo con distintas investigaciones que demuestran que el aumento de los niveles de la metalotioneína a través de la regulación del Nrf2 juega un papel importante en la prevención de la nefropatía y la miocardiopatía diabética^{324,325}. En conjunto, todos estos resultados indican que la dieta rica en cacao evitó el descenso de los niveles fosforilados del Nrf2 y de sus proteínas antioxidantes, principalmente la metalotioneína, contribuyendo a prevenir el estrés oxidativo y el daño vascular en los animales diabéticos. Aunque el papel del Nrf2 en la diabetes no está totalmente esclarecido, sí que se ha demostrado que la disminución de los niveles del p-Nrf2 en las arterias contribuye al desarrollo del estrés oxidativo, lo que favorece la remodelación vascular y la disfunción endotelial en la diabetes³²⁶. En consecuencia, se ha sugerido que el uso de activadores del Nrf2 podría ser una estrategia interesante para prevenir el desarrollo de las complicaciones vasculares durante la diabetes.

Finalmente, es interesante mencionar que las propiedades beneficiosas sobre la salud del cacao se han asociado principalmente a la presencia de los flavanoles (la EC y las procianidinas) y de las metilxantinas (la teobromina). En este sentido, se ha sugerido que la EC y las procianidinas parecen ser los principales responsables de los efectos beneficiosos vasculares del cacao²⁸⁵. En cuanto a la teobromina, si bien no se observa ningún efecto beneficioso cuando se consume sola, se ha comprobado que en combinación con los flavanoles del cacao produce un efecto superior²⁶⁸.

En resumen, este estudio muestra por primera vez el efecto protector de los flavanoles del cacao frente al daño oxidativo vascular que aparece en la diabetes. Este efecto incluye la mejora del estado hemodinámico de los animales diabéticos, así como la prevención de la rigidez arterial y la remodelación vascular. En cuanto a la regulación molecular, el cacao fue capaz de evitar la disminución de los niveles de la SIRT-1 inducidos por la diabetes, así como la activación de la NOX-2 y de la NOX-4 y en consecuencia el aumento de la generación de los ROS. Igualmente, evitó la disminución de los niveles del Nrf2 activo y de sus proteínas antioxidantes asociadas, colaborando así a prevenir el estrés oxidativo y el daño vascular en las arterias de los animales diabéticos. Sobre todo, estos resultados muestran un nuevo mecanismo para reducir el riesgo cardiovascular en la población diabética y apoyan el uso del cacao como potencial agente protector frente al desarrollo de las complicaciones vasculares en la diabetes.

3. Capítulo tercero - Efecto de los flavanoles del cacao sobre la salud intestinal y la microbiota intestinal en ratas diabéticas ZDF.

Determinados trastornos metabólicos, como la diabetes, se han asociado con una alteración de la composición de la microbiota intestinal³²⁷. De acuerdo con esto, numerosos estudios han mostrado que ciertos compuestos de la dieta pueden atenuar el riesgo de T2D por su habilidad para modular la composición de la microbiota intestinal³²⁸. En este sentido, el cacao contiene fibra y otros compuestos bioactivos, como son los polifenoles y las metilxantinas (principalmente la teobromina), que han mostrado ser capaces de modificar la microbiota intestinal^{329,330}. En concreto, se ha descrito que la suplementación con cacao produce un efecto positivo en el ecosistema microbiano intestinal de animales e individuos sanos, promoviendo el bienestar en el huésped^{331,332}. Sin embargo, el efecto del cacao sobre la microbiota intestinal en la diabetes no ha sido hasta el momento evaluado. Por tanto, el objetivo de este estudio fue investigar si el cacao era capaz de mejorar la salud intestinal y modular la disbiosis en las ratas diabéticas ZDF, contribuyendo de esta forma a sus demostrados efectos antidiabéticos¹⁷¹.

En este estudio, se ha encontrado que la dieta rica en cacao fue capaz de aumentar en los animales diabéticos los niveles de las proteínas ZO-1 y mucina, ambas implicadas en la integridad de la mucosa colónica, lo que se asocia con una mejora de la estructura y la salud intestinal³³³. Resultados similares se han obtenido en estudios previos, en los que el consumo de flavanoles procedentes de un extracto de semilla de uva también provocó un aumento de la expresión de las proteínas relacionadas con las uniones intercelulares y con la permeabilidad intestinal en ratas sanas^{334,335}. Más importante, se ha demostrado que la ingesta de *Salvia miltiorrhiza*, una fuente natural de ácidos fenólicos, mejora la salud intestinal de ratones diabéticos tratados con estreptozotocina mediante el aumento de los niveles de las proteínas relacionadas con la permeabilidad intestinal³³⁶.

Igualmente, el daño de la barrera intestinal se relaciona con el desarrollo del proceso inflamatorio y la endotoxemia metabólica³³⁷. De acuerdo con esto, en este estudio se ha visto un aumento de los niveles de las citoquinas proinflamatorias (la IL-6, el TNF α y el MCP-1) en el colon de las ratas diabéticas, sin embargo, este efecto no se produjo en aquellos animales que fueron alimentados con cacao. Estos resultados están en línea con distintas investigaciones que demuestran el efecto antiinflamatorio del cacao sobre la mucosa intestinal y, con ello, la mejora de la salud intestinal^{338,339,340}.

Pero, sobre todo, estos resultados ponen de manifiesto que la ingesta de cacao puede mejorar la integridad de la barrera intestinal y reducir la inflamación colónica en animales diabéticos. Aunque el mecanismo molecular que subyace a este efecto no está claro, se puede sugerir que podría estar

parcialmente relacionados con cambios en la composición bacteriana intestinal inducidos por el cacao^{331,332}.

El estudio del microbioma de los animales mostró que las ratas diabéticas ZDF-C presentaban una composición microbiana diferente a la encontrada en los animales ZL sanos. A nivel de filo, los principales cambios que se observaron en los animales diabéticos fueron el aumento de la abundancia relativa del filo *Proteobacteria* y la disminución de la del filo *Verrucomicrobia*, mientras que la abundancia de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes* no se encontró modificada. Sin embargo, la relación entre las abundancias relativas del filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (F/B), que se considera un biomarcador de disbiosis, se incrementó en las ratas diabéticas. Por otro lado, la microbiota de los animales diabéticos que fueron tratados con el cacao (ZDF-Co) fue también diferente del resto, sugiriendo que el cacao podría tener efectos específicos en la composición de la microbiota intestinal de los animales diabéticos. Sin embargo, la dieta rica en cacao no pudo revertir el aumento de la relación F/B, que es característico de los modelos murinos de obesidad³⁴¹. En este sentido, se ha descrito que los polifenoles son capaces de modular la composición de la microbiota intestinal sin modificar la relación entre las abundancias relativas de los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*³⁴². Además, esta relación no siempre se asocia con la obesidad y se ha sugerido que son los cambios específicos de la microbiota intestinal los principales responsables de las alteraciones metabólicas en estos animales³⁴³. De acuerdo con esto, en este estudio se ha encontrado que la ingesta de cacao modificó ciertos grupos bacterianos clave, los cuales podrían estar relacionados con la mejora de la homeostasis glucídica y de la salud intestinal en los animales diabéticos.

El aumento de las bacterias del filo *Proteobacteria* está estrechamente relacionado con los trastornos metabólicos y con la inflamación intestinal³⁴⁴. En este estudio, el incremento de la abundancia relativa del filo *Proteobacteria* en las ratas diabéticas fue producido por un aumento de las bacterias que pertenecían al género *Escherichia* (de la familia *Enterobacteriaceae*), que está asociado con ciertas patologías intestinales en los humanos y en los animales³⁴⁵. Del mismo modo, aunque la abundancia relativa del filo *Firmicutes* no cambió en las ratas diabéticas, ciertos géneros sí se modificaron en comparación con los de las ratas control; en concreto los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus* aumentaron en las ratas diabéticas, mientras que el género *Oscillospora* disminuyó. *Enterococcus* es un género bacteriano cuya presencia se asocia con la disfunción intestinal y las enfermedades inflamatorias³⁴⁶.

Por otro lado, el género *Lactobacillus* se considera un grupo de bacterias con capacidad para ejercer efectos beneficiosos sobre el metabolismo del hospedador; no obstante, investigaciones recientes indican que el aumento de este género podría estar también relacionado con la obesidad y el ambiente

inflamatorio^{347,348}, lo que estaría de acuerdo con los resultados encontrados en los animales diabéticos en este estudio. Por su parte, el género *Oscillospira* se asocia con efectos antiinflamatorios en el intestino, encontrándose disminuido en los pacientes afectados de T2D y de obesidad^{349,350}. Es interesante remarcar que la dieta rica en cacao previno todos estos cambios negativos en la microbiota intestinal de los animales diabéticos. De forma similar, polifenoles como la quercetina y el resveratrol también fueron capaces de modular las especies bacterianas asociadas con ciertas enfermedades y con la inflamación, disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias y mejorar el metabolismo glucídico de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa³⁵¹.

El género *Akkermansia* (del filo *Verrucomicrobia*) se encuentra disminuido durante la obesidad y la diabetes³⁵², lo que se correlaciona con los resultados obtenidos en este estudio en las ratas diabéticas. Por su parte, se ha descrito que la ingesta de polifenoles induce la expresión de *A. muciniphila*, lo que se asocia también con una mejora del peso corporal y de la tolerancia a la glucosa³⁵³. Sin embargo, en este estudio observamos que la suplementación con cacao de las ratas diabéticas no logró restaurar el descenso de la abundancia relativa de *A. muciniphila*, a pesar de que el metabolismo glucídico y la salud intestinal mejoró notablemente en estas ratas. Resultados similares de esta falta de correlación entre el aumento del género *Akkermansia* y la mejora de la T2D se han observado también en ratones obesos tratados con resveratrol³⁵⁴ o con extractos de polifenoles de la corteza de la canela y del orujo de la uva³⁵⁵. Por tanto, se necesitan más estudios que puedan aclarar el verdadero papel de este grupo bacteriano en la T2D.

En este estudio también se han mostrado cambios en la composición de la microbiota que solo se observaron en los animales alimentados con cacao. Más concretamente, el tratamiento de las ratas diabéticas con una dieta rica en cacao aumentó la abundancia relativa del género *Blautia*, un grupo bacteriano que se ha correlacionado negativamente con la obesidad y la T2D^{356,357}. Este género se relaciona también con la producción de ciertos SCFAs (principalmente del acetato) y, por ello, con los niveles totales de los SCFAs, los cuales fueron mayores en las heces de las ratas diabéticas tratadas con cacao. El acetato puede mejorar la funcionalidad de la barrera intestinal estimulando la diferenciación de las células de Goblet o reforzando las uniones estrechas de las células epiteliales³⁵⁸.

En línea con esto, distintas investigaciones en un modelo animal de inflamación intestinal demuestran que la suplementación con los polifenoles procedentes de la piel de la uva aumentan la producción de los SCFAs (principalmente del acetato y del butirato), así como los niveles de la ZO-1 colónica³⁵⁹. Igualmente, en este estudio se ha demostrado que el incremento de la abundancia relativa del género *Blautia* está directamente relacionado con el aumento de los niveles de la ZO-1 y de la mucina. Además, la alimentación

de las ratas diabéticas con una dieta rica en cacao disminuyó la abundancia relativa de las bacterias productoras de lactato (principalmente del género *Lactobacillus* y del *Enterococcus*) y, por tanto, de los niveles totales de lactato (precursor de ciertos SCFAs) encontrados en las heces. Un aumento de los niveles del lactato en modelos animales y en pacientes con T2D y obesidad se ha relacionado directamente con el proceso inflamatorio^{357,360}. De acuerdo con esto, nuestros resultados muestran una correlación positiva entre la abundancia relativa de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* y el peso corporal y los parámetros relacionados con la homeostasis glucídica, con la alteración de la integridad intestinal y con el proceso inflamatorio. Como se ha demostrado previamente, la intervención nutricional puede ayudar a modular la composición de la microbiota intestinal y, con ello, la producción de los SCFAs, contribuyendo a recuperar la funcionalidad de la barrera colónica, atenuar la inflamación y mejorar el metabolismo glucídico³⁵⁵. Por lo tanto, todos estos resultados sugieren que la modulación de la microbiota intestinal podría ser uno de los mecanismos involucrados en los efectos antidiabéticos del cacao.

En resumen, en este estudio se ha demostrado por primera vez que la suplementación de la dieta con cacao mejora la integración y la inflamación intestinal que aparece en los animales diabéticos ZDF. Además, la ingesta de cacao es capaz de modificar la microbiota intestinal de los animales diabéticos hacia un perfil más saludable y esos cambios han sido directamente relacionados con la mejora de la homeostasis glucídica y la salud intestinal de estos animales. Por tanto, se puede sugerir que la modulación de la microbiota intestinal por el cacao puede ser en parte responsable de sus efectos metabólicos en los animales diabéticos.

4. Capítulo cuarto - Efecto antiinflamatorio de los flavanoles del cacao en modelos de experimentación.

4.1. Efecto del cacao, la EC y los metabolitos colónicos sobre la inflamación en células renales y en el riñón de ratas diabéticas ZDF.

La DN es una de las complicaciones diabéticas que contribuye a exacerbar la severidad y mortalidad de la diabetes¹⁷⁰. En los últimos años el conocimiento sobre los procesos fisiopatológicos que conducen a la DN ha aumentado notablemente desde un punto de vista genético y molecular. Así, a la visión clásica de las alteraciones hemodinámicas y metabólicas como principales causas del daño renal en la diabetes se han unido otros factores, lo que indica que estos componentes tradicionales son solo un aspecto parcial de una situación más compleja. Uno de los cambios más relevantes se relaciona con la participación de los procesos inflamatorios, si bien aún hoy se desconoce el papel de las citoquinas inflamatorias en el daño renal durante la diabetes³⁶¹.

Distintos trabajos han descrito que la EC y el cacao poseen actividades antioxidantes y antiinflamatorias^{215,362,363}. De esta manera, diversos estudios han demostrado que la EC y el cacao pueden retrasar o prevenir el deterioro asociado a la diabetes mediante la reducción de la glucemia y la modulación del estrés oxidativo^{195,215,219,231}. No obstante, en la actualidad se desconoce si estas sustancias, así como los metabolitos colónicos derivados de su ingesta, pueden proteger al riñón del daño inflamatorio asociado a la DN. Por tanto, el propósito de este estudio fue investigar los posibles efectos antiinflamatorios de la EC, el DHBA, el DHPAA, y el HPPA (metabolitos colónicos derivados de la ingesta de flavanoles empleados en los estudios anteriores) en las células tubulares proximales NRK-52E, así como los de una dieta rica en cacao en los animales diabéticos ZDF. También se examinó la posible relación entre el posible efecto antiinflamatorio de las sustancias antes mencionadas frente al estrés oxidativo.

En la diabetes se produce un incremento de la glucemia y de la endotoxemia que mayoritariamente resulta del LPS, principal componente de endotoxina que se libera de la pared de las bacterias Gram negativas³⁶⁴. Así pues, en este trabajo se seleccionó una concentración de glucosa comúnmente usada en la literatura (30 mM) y se evaluaron diferentes concentraciones del LPS sobre las células en cultivo. En estas condiciones experimentales se observó que no se modificaba la viabilidad celular, pero sí se producía un incremento en la generación de los ROS y de las citoquinas proinflamatorias TNF- α e IL-6 en las células tubulares NRK-52E y en los animales diabéticos. Esta situación pone de manifiesto el estado proinflamatorio inducido en las células en cultivo, así como el grado de inflamación crónica que padecen los animales diabéticos (ZDF-C). De manera similar, diversos autores han descrito

un ambiente pro-oxidativo y proinflamatorio durante la DN en modelos *in vitro*, animales y pacientes diabéticos^{365–367}. De hecho, el grado leve de inflamación crónica encontrado en la diabetes se ha asociado directamente con la patogénesis de las complicaciones diabéticas, incluida la DN³⁶¹.

Por el contrario, la pre-incubación de las células con la EC y el DHBA y, posteriormente expuestas a altas concentraciones de glucosa y LPS, así como la administración de la dieta rica en cacao a las ratas ZDF consiguieron prevenir la generación de los ROS en las células tubulares en cultivo (también en los animales, como se ha mostrado en secciones anteriores), así como el aumento de los niveles del TNF- α y la IL-6 *in vivo* e *in vitro*. En este sentido, se ha de mencionar que el incremento de estas citoquinas proinflamatorias se ha relacionado con un aumento del estrés, como hemos mencionado antes, pero también con la promoción del progreso del daño renal asociado a la DN^{361,366}. Por tanto, la prevención del aumento de estas citoquinas proinflamatorias y el mantenimiento del equilibrio redox por diversos compuestos naturales se ha relacionado con un alivio del daño en el riñón^{367,368}. En concreto, los altos niveles del TNF- α se han asociado con un incremento de la albuminuria, lo que está de acuerdo con nuestros resultados, dado que las ratas ZDF-C mostraron unos valores más altos de albúmina que los animales ZDF-Co. Por su parte, la expresión renal de la IL-6 se ha relacionado con la proliferación mesangial, la atrofia tubular y la intensidad de los infiltrados tisulares en diversos modelos de enfermedad renal, lo que sugiere que puede contribuir al progreso de la DN³⁶⁹. Estos altos niveles de la IL-6 se podrían relacionar también con las alteraciones estructurales encontradas en la corteza renal de los animales ZDF-C, y que se prevenían en gran medida en el grupo ZDF-Co, al igual que ocurre con el incremento en la expresión renal de la IL-6. Además, se ha de mencionar que los niveles de expresión del TNF- α y la IL-6 fueron más altos en los túbulos que en los glomérulos, lo que de nuevo apunta a que las alteraciones tubulares se producen de manera más temprana que las glomerulares^{170,276}.

El MCP-1 es un factor quimiotáctico que activa a los monocitos y a los macrófagos y promueve su migración hacia las lesiones, por lo que parece tener un papel en el desarrollo de la DN³⁶⁹. Por su parte, el CD68 es un marcador de macrófagos, y la infiltración de macrófagos es un mediador importante en la fibrosis renal³⁷⁰. En este estudio, los niveles del MCP-1 y del CD68 no se modificaron en ningún grupo de animales, y solo se observó para ambas proteínas una ligera tendencia a incrementar en la corteza renal de las ratas ZDF-C. Diversos trabajos han mostrado un aumento del MCP-1 y del CD68 en los animales diabéticos, si bien las lesiones renales que presentaron dichos animales fueron más severas que las de las ratas ZDF-C del presente estudio. Así, los valores de hiperglucemia, creatinina, urea y proteinuria fueron muy superiores en aquellos animales que mostraron incrementos en los valores del MCP-1 y del CD68 en comparación con los presentados por los animales

Discusión integradora – Capítulo cuarto

ZDF-C del presente estudio; además, en esos trabajos se detectó fibrosis, y los niveles circulantes de la IL-6 y del TNF- α estuvieron aumentados^{371–373}. En este sentido, cabe mencionar que los valores séricos de la IL-6 y del TNF- α fueron iguales en las ratas ZL y ZDF-C³⁷⁴. Por tanto, se podría especular que esta ausencia de diferencias para el MCP-1 y el CD68 entre los animales diabéticos ZDF y los ZL se debe a que las ratas diabéticas ZDF se encuentran en un estadio temprano de la DN^{170,375}.

La producción del TNF- α , de la ICAM-1 y de la VCAM-1, que pueden estar estimuladas por el LPS, conduce a la inflamación en la enfermedad renal³⁷⁶. En concreto, la expresión de la ICAM-1 se puede inducir localmente por la hiperglucemia, el estrés oxidativo, la hiperlipidemia, la hiperinsulinemia y el TNF- α , entre otros factores^{377,378}. La ICAM-1 se relaciona con la activación de los leucocitos y la adherencia al endotelio en respuesta a la inflamación³⁶⁹; así, y como se ha mencionado para el MCP-1 y el CD68, diferentes modelos experimentales de DN han mostrado que la expresión de la ICAM-1 se relaciona directamente con la gravedad del daño renal, de manera que la ICAM-1 juega un papel muy importante en la promoción de la infiltración de los macrófagos y la DN^{369,379}, y su bloqueo conduce a la reducción de la nefropatía³⁸⁰. En este sentido, se ha descrito que las antocianinas y la genisteína disminuyen la producción de marcadores de inflamación como la ICAM-1 en modelos *in vitro* e *in vivo* de DN^{200,381}. Por otro lado, en diversos estudios clínicos se ha mostrado un aumento en la producción de la VCAM-1 en los túbulos y/o glomérulos renales dañados dependiendo del estado de la DN^{382,383}. De acuerdo con esto, los altos niveles de la VCAM-1, mayoritariamente observados en los túbulos de los animales ZDF-C, se relacionarían con una DN temprana que se prevenía parcialmente en el grupo ZDF-Co. También se ha descrito que el EGCG atenuó los cambios patológicos (incluidos la expansión de la matriz mesangial y la hipertrofia glomerular) y redujo la expresión de marcadores inflamatorios como la ICAM-1 y la VCAM-1 en los ratones diabéticos^{384,385}. En relación con la VCAM-1, se ha de destacar que esta proteína se induce por los ROS³⁸⁶, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos; así las ratas ZDF-C presentaron altos niveles renales de los ROS y de la VCAM-1, mientras que el aumento de ambos parámetros se previno significativamente en las ratas alimentadas con cacao (ZDF-Co).

La ruta del NF- κ B es una vía clásica para la regulación de la expresión de las citoquinas/quimioquinas en respuesta a la inflamación y, de hecho, el estrés oxidativo (ROS) y el TNF- α juegan un papel muy importante en el inicio y continuación de la señalización de este factor de transcripción y de la inflamación incluida la DN^{387,388}, como se encontró en las ratas ZDF-C. Por su parte, el cacao se ha descrito que exhibe actividades antiinflamatorias en diversas enfermedades crónicas³⁶²; así la disminución de la expresión del p-p65-NF- κ B observada en las ratas ZDF-C se asoció con el descenso del estrés

(ROS) y los niveles del TNF- α . De manera similar, la administración del principal flavanol del cacao, la EC, previno el daño en la corteza renal de las ratas, ya que disminuyó el estrés oxidativo y diversos factores proinflamatorios (el NF- κ B, el TNF- α y la IL-6)^{265,389}.

En resumen, la EC y el cacao, así como uno de sus principales metabolitos colónicos, el DHBA, protegen a las células renales del daño inflamatorio causado por la diabetes al disminuir la liberación de citoquinas inflamatorias (el TNF- α y la IL-6) y moléculas de adhesión (la ICAM-1 y la VCAM-1), y regular el estado redox mediante la modulación del NF- κ B, factor clave que relaciona el estrés oxidativo y la inflamación.

4.2. Efecto del cacao y una mezcla de sus metabolitos colónicos sobre la inflamación en células endoteliales y en la arteria de ratas diabéticas ZDF.

La inflamación crónica que está presente en la obesidad y la T2D desempeña un papel clave en el inicio y el progreso de las complicaciones vasculares³⁹⁰. En este sentido, numerosos estudios *in vitro* y en modelos animales de experimentación han demostrado que los flavonoides tienen el potencial de prevenir la aparición y el desarrollo de numerosas enfermedades inflamatorias o que causan con inflamación³⁹¹. Como se ha mostrado previamente, los metabolitos colónicos que se obtienen tras la ingesta de estos flavonoides son capaces de aumentar la función de las células endoteliales *in vitro* y de proteger su funcionalidad y muerte en condiciones de estrés oxidativo. Estos resultados han sido igualmente confirmados *in vivo* en un modelo animal de T2D. Sin embargo, hasta el momento, el papel de estos metabolitos colónicos sobre la inflamación vascular no ha sido investigado. Por tanto, el objetivo de este estudio ha sido evaluar el posible efecto protector del cacao y sus metabolitos frente a una situación de inflamación vascular. Para ello, hemos empleado las células endoteliales EA.hy926 tratadas con TNF- α como modelo celular de inflamación *in vitro* y las ratas ZDF obesas y diabéticas como modelo de inflamación vascular *in vivo*.

Las citoquinas proinflamatorias, incluido el TNF- α , juegan un papel importante en la inflamación vascular y, en consecuencia, en los trastornos cardiovasculares y metabólicos³⁹². En este estudio hemos encontrado que el pre-tratamiento de las células endoteliales con los metabolitos colónicos (el DHPAA, el DHBA y el HPPA) es capaz de reducir la liberación de la IL-6 inducida por el TNF- α . En particular, la mezcla de metabolitos (MIX) resultó ser la más eficaz. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos previamente en los que el tratamiento *in vitro* con la mezcla de metabolitos aumentaba la producción del NO de manera más eficaz que los metabolitos de forma individual. Por tanto, una vez más se demuestra que el efecto

Discusión integradora – Capítulo cuarto

beneficioso de las dietas ricas en flavanoles se debe a la actividad biológica sinérgica de los metabolitos circulantes²⁹².

El aumento de la IL-6 se relaciona con la activación del factor de transcripción NF- κ B que se transloca al núcleo donde induce la expresión de diferentes genes proinflamatorios, principalmente la COX-2 y la iNOS³⁹³. De acuerdo con esto, la mezcla de metabolitos colónicos fue capaz también de inhibir la activación de este factor en las células endoteliales tratadas con el TNF- α y la expresión de las enzimas inflamatorias COX-2 e iNOS. Resultados similares se han obtenido con las procianidinas del cacao que fueron capaces de inhibir la activación del factor NF- κ B inducida por el TNF α y la expresión de la iNOS en células Caco-2³⁹⁴ y la expresión de la IL-8 en células de colon HT-29 estimuladas con el TNF- α ³⁹⁵. Igualmente, se ha descrito que la EC es capaz de ejercer efectos antiinflamatorios *in vivo* mediante la inhibición de la activación del NF- κ B³⁹⁶. En este estudio, se demuestra por primera vez que los ácidos fenólicos derivados del metabolismo colónico de los flavonoides pueden igualmente prevenir la activación del NF- κ B y, por tanto, contribuir en la protección de daño vascular ejercido por los flavanoles del cacao.

La prevención de la expresión de las proteínas de adhesión vascular como la ICAM-1 y la VCAM-1, implicadas en el reclutamiento de leucocitos en áreas inflamadas, ejerce una importante acción protectora al atenuar la inflamación vascular³⁹⁷. El factor de transcripción NF- κ B no sólo regula la expresión de citoquinas y enzimas inflamatorias, sino que también es capaz de modular la expresión de estas moléculas de adhesión celular involucradas en la inflamación³⁹³. Se ha descrito que diversos flavonoides como la EC, la ECG, la EGC y la EGCG son capaces de disminuir la expresión de la ICAM-1, la VCAM-1 y la E-selectina en células endoteliales tratadas con el TNF- α ³⁹⁸. De acuerdo con esto, en este estudio hemos encontrado que el tratamiento de las células endoteliales con la mezcla de metabolitos colónicos derivados de los flavonoides también fue capaz de inhibir la expresión de la ICAM-1 y la VCAM-1 inducido por el TNF- α y, en consecuencia, la adhesión de monocitos a las células endoteliales. En conjunto, todos estos resultados ponen de manifiesto la importancia de los metabolitos colónicos como agentes antiinflamatorios y su importante papel en la prevención de la progresión de la inflamación y las enfermedades cardiovasculares que ejercen los flavanoles del cacao.

Para comprobar el potencial efecto protector de estos compuestos *in vivo* empleamos un modelo animal de obesidad y diabetes como son las ratas ZDF. La presencia de citoquinas inflamatorias en la pared arterial se relaciona con daños vasculares y tienen una profunda influencia en el desarrollo de la aterosclerosis³⁹⁹. De acuerdo con esto, en este estudio encontramos que los animales diabéticos presentaban un aumento de la activación del factor NF- κ B y de la expresión del TNF- α , la iNOS, la VCAM-1 y la ICAM-1 en la arteria aorta. Sin embargo, los animales diabéticos que tomaron la dieta rica en cacao

fueron capaces de atenuar esta inflamación vascular al reducir la activación del factor NF- κ B y la expresión de iNOS, VCAM-1 e ICAM-1. Estos resultados apoyan los obtenidos en un modelo animal de miocarditis en el que la ingesta de un extracto de polifenoles de cacao fue capaz de mejorar la inflamación cardiovascular presente en estos animales⁴⁰⁰. En concreto, el consumo del extracto de cacao redujo la expresión de la IL-1, la IL-6, la E-selectina, la molécula de adhesión VCAM-1, así como la fosforilación y activación del NF- κ B en el corazón de estos animales⁴⁰⁰. Más importante, la reducción en la expresión de diversas moléculas de adhesión como la ICAM-1, la ICAM-3 y la VCAM también se ha observado en personas con sobrepeso después del consumo de 70 g de chocolate negro enriquecido con flavanoles⁴⁰¹. Este efecto del cacao reduciendo la inflamación arterial y el reclutamiento y la migración de monocitos hacia la pared vascular produce un efecto beneficioso sobre la función endotelial y puede contribuir a prevenir el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en los pacientes diabéticos.

En definitiva, en este estudio se muestra por primera que una mezcla de metabolitos colónicos derivados de los flavanoles del cacao es capaz de inhibir la activación del factor de transcripción NF- κ B en las células endoteliales estimuladas con el TNF- α produciendo una disminución de las proteínas inflamatorias IL-6, COX-2, iNOS, VCAM-1 e ICAM-1 así como la adhesión de monocitos. Igualmente, la suplementación con cacao fue capaz de mejorar la inflamación vascular asociada a la obesidad y la T2D mediante la disminución de la activación del factor de transcripción NF- κ B y de la expresión de proteínas proinflamatorias como la IL-6, la iNOS, la VCAM-1 y la ICAM-1 en las arterias de los animales ZDF. Por tanto, los efectos beneficiosos del cacao y sus flavanoles sobre el estrés oxidativo y la inflamación vascular hacen de él un candidato a considerar en el tratamiento de las complicaciones vasculares asociadas a la T2D.

- ❖ El tratamiento de las células NRK-52E con la EC y con los ácidos fenólicos derivados de la transformación microbiana de los flavonoides (el DHBA y el DHPAA) contribuye a regular la homeostasis glucídica renal y proteger del estrés oxidativo y la disfunción renal causada por una concentración alta de glucosa. Estas acciones protectoras relacionadas con el mantenimiento del equilibrio redox tienen lugar a través de la modulación de la SIRT-1 y de la NOX-4, y las asociadas con la homeostasis glucídica se relacionaron con la atenuación del bloqueo de la señalización de la insulina al regular la vía de la PI3K/AKT y de la AMPK.
- ❖ La alimentación con una dieta rica en cacao atenúa el daño renal y el estrés oxidativo de los animales con T2D a través de la modulación de la homeostasis glucídica, la restauración de la estructura morfológica renal, así como a través de la activación de la autofagia y de la inhibición de la apoptosis.
- ❖ El tratamiento de las células EA.hy926 con una mezcla de ácidos fenólicos derivados de la transformación microbiana de los flavonoides induce el aumento de la producción del NO y, por tanto, de su funcionalidad. Este efecto estaría mediado por las vías de señalización de la AMPK y de la PI3K/AKT y la consiguiente fosforilación/activación de la enzima eNOS. Igualmente, estos metabolitos colónicos son capaces de proteger a las células endoteliales de situaciones de estrés oxidativo al prevenir el aumento en la generación de los ROS y la activación de vías de señales relacionadas con el estrés, evitando de esta forma la disfunción endotelial y la muerte celular.
- ❖ La alimentación con una dieta rica en cacao es capaz de atenuar el estrés oxidativo vascular y, en consecuencia, la rigidez arterial y el remodelado aórtico en los animales con T2D a través de la modulación de los niveles arteriales de la SIRT-1 y de la NOXs. Igualmente, el cacao previene de la disminución de los niveles del Nrf2 arterial y de sus antioxidantes asociados, colaborando así en la reducción de este daño oxidativo vascular.
- ❖ La alimentación con una dieta rica en cacao mejora la integridad de la barrera intestinal y la inflamación colónica de las ratas diabéticas. Asimismo, la dieta rica en cacao modifica la composición de la microbiota intestinal y la producción de los SCFAs hacia un perfil microbiano más saludable, sugiriendo que estos cambios podrían estar asociados con la mejora de la homeostasis glucídica y de la salud intestinal.

Conclusiones

- ❖ El tratamiento de las células NRK-52E con la EC y con el ácido fenólico derivado de la transformación microbiana de los flavonoides DHBA contribuye a proteger de la inflamación causada por una concentración alta de glucosa combinada con el LPS a través de la modulación de la producción de citoquinas proinflamatorias (el TNF- α y la IL-6) moléculas de adhesión (la ICAM-1 y la VCAM-1) y estrés oxidativo. Así mismo, en los animales con T2D, la administración de una dieta rica en cacao atenúa la inflamación renal al disminuir la producción de citoquinas (el TNF- α y la IL-6), moléculas de adhesión (la ICAM-1 y la VCAM-1) y factores clave para el proceso oxidativo-inflamatorio (el NF- κ B).
- ❖ El tratamiento de las células EA.hy926 con una mezcla de ácidos fenólicos derivados de la transformación microbiana de los flavonoides protege de la inflamación inducida por el TNF- α mediante la modulación de la IL-6, el NF- κ B, la iNOS, la COX-2, la ICAM-1 y la VCAM-1, así como la disminución de la adhesión de los monocitos. Además, la alimentación con una dieta rica en cacao es capaz de atenuar la inflamación aórtica en los animales con T2D a través de la regulación de los niveles arteriales de la IL-6, el NF- κ B, la iNOS, la ICAM-1 y la VCAM-1.

En resumen, los resultados obtenidos en cultivos celulares y en animales de experimentación han puesto de manifiesto que el cacao, sus flavanoles y sus metabolitos colónicos podrían proteger frente al desarrollo y progreso de importantes complicaciones diabéticas, ya que son capaces de aliviar el estrés oxidativo, la disfunción renal, la remodelación aórtica y la inflamación inducida por la situación diabética. Así mismo, el cacao parece modificar la composición de la microbiota intestinal hacia un perfil microbiano más saludable en la T2D.

1. Cory H, Passarelli S, Szeto J, Tamez M, Mattei J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. *Frontiers in Nutrition* **5**, doi: 10.3389/fnut.2018.00087 (2018).
2. Grosso G. Effects of polyphenol-rich foods on human health. *Nutrients* **10**, doi:10.3390/nu10081089 (2018).
3. Cao H, Ou J, Chen L, Zhang Y, Szkudelski T, Delmas D, Daglia M, Xiao J. Dietary polyphenols and type 2 diabetes: Human Study and Clinical Trial. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 3371–3379 (2018).
4. Rodríguez-Pérez C, Segura-Carretero A, del Mar Contreras M. Phenolic compounds as natural and multifunctional anti-obesity agents: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 1212–1229 (2019).
5. Oliviero F, Scanu A, Zamudio-Cuevas Y, Punzi L, Spinella P. Anti-inflammatory effects of polyphenols in arthritis. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **98**, 1653–1659 (2018).
6. Serino A, Salazar G. Protective role of polyphenols against vascular inflammation, aging and cardiovascular disease. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11010053 (2019).
7. Colizzi C. The protective effects of polyphenols on Alzheimer's disease: A systematic review. *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions* **5**, 184–196 (2019).
8. Abbaszadeh H, Keikhaei B, Mottaghi S. A review of molecular mechanisms involved in anticancer and antiangiogenic effects of natural polyphenolic compounds. *Phytotherapy Research* **33**, 2002–2014 (2019).
9. Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazzo E, Izzo AA, Novellino E, Santini A. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research* **33**, 2221–2243 (2019).
10. Salehi B, Fokou PVT, Sharifi-Rad M, Zucca P, Pezzani R, Martins N, Sharifi-Rad J. The therapeutic potential of naringenin: A review of clinical trials. *Pharmaceuticals* **12**, doi:10.3390/ph12010011 (2019).
11. Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, Kręgiel D, Sharifi-Rad J, Durazzo A, Lucarini M, Santini A, Souto EB, Novellino E, Antolak H, Azzini E, Setzer WN, Martins N. The therapeutic potential of Apigenin. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, doi:10.3390/ijms20061305 (2019).
12. Rietjens IMCM, Lousse J, Beekmann K. The potential health effects of dietary phytoestrogens. *British Journal of Pharmacology* **174**, 1263–1280 (2017).
13. Kimble R, Keane KM, Lodge JK, Howatson G. Dietary intake of anthocyanins and risk of cardiovascular disease: A systematic review and meta-analysis of prospective cohort studies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 3032–3043 (2019).

Bibliografía

14. Reyes-Farias M, Carrasco-Pozo C. The Anti-Cancer Effect of Quercetin: Molecular Implications in Cancer Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 3177 (2019).
15. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JP, Tognolini M, Borges G, Crozier A. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* **18**, 1818–1892 (2013).
16. Shah SR, Alweis R, Najim NI, Dharani AM, Jangda MA, Shahid M, Kazi AN, Shah SA. Use of dark chocolate for diabetic patients: a review of the literature and current evidence. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives* **7**, 218–221 (2017).
17. Ottaviani JI, Heiss C, Spencer JPE, Kelm M, Schroeter H. Recommending flavanols and procyanidins for cardiovascular health: Revisited. *Molecular Aspects of Medicine* **61**, 63–75 (2018).
18. Xie X, Yi W, Zhang P, Wu N, Yan Q, Yang H, Tian C, Xiang S, Du M, Getachew Assefa E, Zuo X, Ying C. Green tea polyphenols, mimicking the effects of dietary restriction, ameliorate high-fat diet-induced kidney injury via regulating autophagy flux. *Nutrients* **9**, doi:10.3390/nu9050497 (2017).
19. Dinh TC, Thi Phuong TN, Minh LB, Minh Thuc VT, Bac ND, Van Tien N, Pham VH, Show PL, Tao Y, Nhu Ngoc VT, Bich Ngoc NT, Jurgoński A, Thimiri Govinda Raj DB, Van Tu P, Ha VN, Czarzasta J, Chu DT. Dinh TC, Thi Phuong TN, Minh LB, Minh Thuc VT, Bac ND, Van Tie. The effects of green tea on lipid metabolism and its potential applications for obesity and related metabolic disorders - An existing update. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* **13**, 1667–1673 (2019).
20. Ramadan G, El-Beih NM, Talaat RM, Abd El-Ghffar EA. Anti-inflammatory activity of green versus black tea aqueous extract in a rat model of human rheumatoid arthritis. *International Journal of Rheumatic Diseases* **20**, 203–213 (2017).
21. Yu S, Zhu L, Wang K, Yan Y, He J, Ren Y. Green Tea Consumption and Risk of Breast Cancer and Recurrence-A Systematic Review and updated meta-analysis of case-control studies. *Medicine* **98**, doi: 10.1097/MD.00000000000016147 (2019).
22. Roche A, Ross E, Walsh N, O'Donnell K, Williams A, Klapp M, Fullard N, Edelstein S. Representative literature on the phytonutrients category: Phenolic acids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **57**, 1089–1096 (2017).
23. Bao L, Li J, Zha D, Zhang L, Gao P, Yao T, Wu X. Chlorogenic acid prevents diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress and inflammation through modulation of the Nrf2/HO-1 and NF-κB pathways. *International Immunopharmacology* **54**, 245–253 (2018).

24. Pagano E, Romano B, Izzo AA, Borrelli F. The clinical efficacy of curcumin-containing nutraceuticals: An overview of systematic reviews. *Pharmacological Research* **134**, 79–91 (2018).
25. Ramírez-Garza SL, Laveriano-Santos EP, Marhuenda-Muñoz, M, Storniolo CE, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, Lamuela-Raventós RM. Health effects of resveratrol: Results from human intervention trials. *Nutrients* **10**, doi:10.3390/nu10121892 (2018).
26. Rauf A, Imran M, Butt MS, Nadeem M, Peters DG, Mubarak MS. Resveratrol as an anti-cancer agent: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58**, 1428–1447 (2018).
27. Senthilkumar HA, Fata JE, Kennelly EJ. Phytoestrogens: The current state of research emphasizing breast pathophysiology. *Phytotherapy Research* **32**, 1707–1719 (2018).
28. Pinto P, Santos CN. Worldwide (poly)phenol intake: assessment methods and identified gaps. *European Journal of Nutrition* **56**, 1393–1408 (2017).
29. Bhagwat S, Haytowitz DB. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3 Prepared by USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods Release 3 Prepared by. *U.S. Department of Agriculture* **3**, 1–156 (2015).
30. Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation* **2010**, 1–9 (2010).
31. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of enology and viniculture* **16**, 144–158 (1965).
32. Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihaue AM, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: Strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition* **99**, 12–22 (2008).
33. Zamora-Ros R, Knaze V, Rothwell JA, Hémon B, Moskal A, Overvad K, Tjønneland A, Kyrø C, Fagherazzi G, Boutron-Ruault MC, Touillaud M, Katzke V, Kühn T, Boeing H, Förster J, Trichopoulou A, Valanou E, Peppas E, Palli D, Agnoli C, Ricceri F, Tumino R, de Mag. Dietary polyphenol intake in Europe: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *European Journal of Nutrition* **55**, 1359–1375 (2018).
34. Costea T, Nagy P, Ganea C, Szöllősi J, Mocanu MM. Molecular mechanisms and bioavailability of polyphenols in prostate cancer. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, doi:10.3390/ijms20051062 (2019).

Bibliografía

35. Chen ML, Shah V, Patnaik R, Adams W, Hussain A, Conner D, Mehta M, Malinowski H, Lazor J, Huang SM, Hare D, Lesko L, Sporn D, Williams R. Bioavailability and bioequivalence: An FDA regulatory overview. *Pharmaceutical Research* **18**, 1645–1650 (2001).
36. Teng H, Chen L. Polyphenols and bioavailability: an update. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 2040–2051 (2019).
37. Kay CD, Pereira-Caro G, Ludwig IA, Clifford MN, Crozier A. Anthocyanins and Flavanones Are More Bioavailable than Previously Perceived: A Review of Recent Evidence. *Annual Review of Food Science and Technology* **8**, 155–180 (2017).
38. Margalef M, Pons Z, Iglesias-Carres L, Bravo FI, Muguerza B, Arola-Arnal A. Flavanol plasma bioavailability is affected by metabolic syndrome in rats. *Food Chemistry* **231**, 287–294 (2017).
39. Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition* **57**, 1–24 (2018).
40. Braune A, B. M. Bacterial species involved in the conversion of dietary flavonoids in the human gut. *Gut Microbes* **7**, 216–234 (2016).
41. Aragonés G, Danesi F, Del Rio D, Mena P. The importance of studying cell metabolism when testing the bioactivity of phenolic compounds. *Trends in Food Science and Technology* **69**, 230–242 (2017).
42. Williamson G, Clifford MN. Role of the small intestine, colon and microbiota in determining the metabolic fate of polyphenols. *Biochemical Pharmacology* **139**, 24–39 (2017).
43. Torre E. Molecular signaling mechanisms behind polyphenol-induced bone anabolism. *Phytochemistry Reviews* **16**, 1183–1226 (2017).
44. Azam S, Jakaria M, Kim IS, Kim J, Haque ME, Choi DK. Regulation of toll-like receptor (TLR) signaling pathway by polyphenols in the treatment of age-linked neurodegenerative diseases: Focus on TLR4 signaling. *Frontiers in Immunology* **10**, doi: 10.3389/fimmu.2019.01000 (2019).
45. Perrone L, Squillaro T, Napolitano F, Terracciano C, Sampaolo S, Melone MAB. The Autophagy Signaling Pathway: A Potential Multifunctional Therapeutic Target of Curcumin in Neurological and Neuromuscular Diseases. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11081881 (2019).
46. Aparicio-Soto M, Redhu D, Sánchez-Hidalgo M, Fernández-Bolaños JG, Alarcón-de-la-Lastra C, Worm M, Babina M. Olive Oil-Derived Polyphenols Effectively Attenuate Inflammatory Responses of Human Keratinocytes by Interfering with the NF- κ B Pathway. *Molecular Nutrition and Food Research* **63**, doi: 10.1002/mnfr.201900019 (2019).
47. Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting Free Radicals in Oxidative Stress-Related Human Diseases. *Trends in Pharmacological Sciences* **38**, 592–607 (2017).

48. Aslam S, Jahan N, Rahman KU, Zafar F, Ashraf MY. Synergistic interactions of polyphenols & their effect on antiradical Potential. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **30**, 1297–1304 (2017).
49. Bariexca T, Ezdebski J, Redan BW, Vinson J. Pure Polyphenols and Cranberry Juice High in Anthocyanins Increase Antioxidant Capacity in Animal Organs. *Foods* **8**, doi:10.3390/foods8080340 (2019).
50. Rehman K, Akash MSH. Mechanism of Generation of Oxidative Stress and Pathophysiology of Type 2 Diabetes Mellitus: How Are They Interlinked? *Journal of Cellular Biochemistry* **118**, 3577–3585 (2017).
51. Engin, BA, Engin A. Obesity and Lipotoxicity. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **960**, doi: 10.1007/978-3-319-48382-5 (2017).
52. Norris GH, Blesso CN. Dietary and endogenous sphingolipid metabolism in chronic inflammation. *Nutrients* **9**, doi:10.3390/nu9111180 (2017).
53. Francula-Zaninovic S, Nola IA. Management of Measurable Variable Cardiovascular Disease' Risk Factors. *Current Cardiology Reviews* **14**, 153–163 (2018).
54. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, Znaor A, Bray F. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer* **144**, 1941–1953 (2019).
55. Mills S, Stanton C, Lane JA, Smith GJ, Ross RP. Precision nutrition and the microbiome, part I: Current state of the science. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11040923 (2019).
56. Morelli MB, Wang X, Santulli G. Functional role of gut microbiota and PCSK9 in the pathogenesis of diabetes mellitus and cardiovascular disease. *Atherosclerosis* **289**, 176–178 (2019).
57. Dao MC, Clément K. Gut microbiota and obesity: Concepts relevant to clinical care. *European Journal of Internal Medicine* **48**, 18–24 (2018).
58. Tang WH, Kitai T, Hazen SL. Gut microbiota in cardiovascular health and disease. *Circulation Research* **120**, 1183–1196 (2017).
59. Mahmoodpoor F, Rahbar Saadat Y, Barzegari A, Ardalan M, Zununi Vahed S. The impact of gut microbiota on kidney function and pathogenesis. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **93**, 412–419 (2017).
60. Gao R, Gao Z, Huang L, Qin H. Gut microbiota and colorectal cancer. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **36**, 757–769 (2017).
61. Quigley EMM. Microbiota-Brain-Gut Axis and Neurodegenerative Diseases. *Current Neurology and Neuroscience Reports* **17**, doi: 10.1007/s11910-017-0802-6 (2017).

Bibliografia

62. Fava F, Rizzetto L, Tuohy KM. Gut microbiota and health: Connecting actors across the metabolic system. *Proceedings of the Nutrition Society* **18**, doi:10.1017/S0029665118002719 (2019).
63. Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology* **7**, 122–126 (2018).
64. Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative stress in atherosclerosis. *Current Atherosclerosis Reports* **19**, doi: 10.1007/s11883-017-0678- (2017).
65. Moniruzzaman M, Ghosal I, Das D, Chakraborty SB. Melatonin ameliorates H₂O₂-induced oxidative stress through modulation of Erk/Akt/ NF- κ B pathway. *Biological Research* **51**, 1–10 (2018).
66. Parker DJ, Moran A, Mitra K. Studying Mitochondrial Structure and Function in Drosophila Ovaries. *Journal of Visualized Experiments* **2017**, 1–13 (2017).
67. Magnani F, Mattevi A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Current Opinion in Structural Biology* **59**, 91–97 (2019).
68. Moloney JN, Cotter TG. ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell and Developmental Biology* **80**, 50–64 (2018).
69. Parvez S, Long MJC, Poganik JR, Aye Y. Redox signaling by reactive electrophiles and oxidants. *Chemical Reviews* **118**, 8798–8888 (2018).
70. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* **524**, 13–30 (2017).
71. Gaschler MM, Stockwell BR. Lipid peroxidation in cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **482**, 419–425 (2017).
72. Busch CJ, Binder CJ. Malondialdehyde epitopes as mediators of sterile inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**, 398–406 (2017).
73. Rosenfeld MA, Vasilyeva AD, Yurina LV, Bychkova AV. Oxidation of proteins: is it a programmed process? *Free Radical Research* **52**, 14–38 (2018).
74. Sri Harsha PSC, Lavelli V. Use of Grape Pomace Phenolics to Counteract Endogenous and Exogenous Formation of Advanced Glycation End-Products. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11081917 (2019).
75. Manabe Y, Takii Y, Sugawara T. Siphonaxanthin, a carotenoid from green algae, suppresses advanced glycation end product-induced inflammatory responses. *Journal of Natural Medicines* **20**, doi: 10.1007/s11418-019-01354-z (2019).

76. Hollenbach M. The role of glyoxalase-i (Glo-I), advanced glycation endproducts (AGEs), and their receptor (RAGE) in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma (HCC). *International Journal of Molecular Sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18112466 (2017).
77. Herbet M, Korga A, Gawrońska-Grzywacz M, Izdebska M, Piątkowska-Chmiel I, Poleszak E, Wróbel A, Matysiak W, Jodłowska-Jędrych B, Dudka J. Chronic Variable Stress is Responsible for Lipid and DNA Oxidative Disorders and Activation of Oxidative Stress Response Genes in the Brain of Rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2017**, doi: 10.1155/2017/7313090 (2017).
78. Nissanka N, Moraes CT. Mitochondrial DNA damage and reactive oxygen species in neurodegenerative disease. *FEBS Letters* **592**, 728–742 (2018).
79. Chikara S, Nagaprashantha LD, Singhal J, Horne D, Awasthi S, Singhal SS. Oxidative stress and dietary phytochemicals: Role in cancer chemoprevention and treatment. *Cancer Letters* **413**, 122–134 (2018).
80. García-Quirós E, Alché JD, Karpinska B, Foyer CH. Glutathione redox state plays a key role in flower development and pollen vigour. *Journal of Experimental Botany* **26**, doi:10.1093/jxb/erz376 (2019).
81. Giustarini D, Colombo G, Garavaglia ML, Astori E, Portinaro NM, Reggiani F, Badalamenti S, Aloisi AM, Santucci A, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I. Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. *Free Radical Biology and Medicine* **112**, 360–375 (2017).
82. Wei Y, Su Z, Kang XF, Guo Y, Mu X. Single-molecule transformation and analysis of glutathione oxidized and reduced in nanopore. *Talanta* **167**, 526–531 (2017).
83. Chen QM, Maltagliati AJ. Nrf2 at the heart of oxidative stress and cardiac protection. *Physiological Genomics* **50**, 77–97 (2018).
84. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry* **44**, 532–553 (2017).
85. Lewandowski Ł, Kepinska M, Milnerowicz H. Inhibition of copper-zinc superoxide dismutase activity by selected environmental xenobiotics. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **58**, 105–113 (2018).
86. Glorieux C, Calderon PB. Catalase, a remarkable enzyme: Targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. *Biological Chemistry* **398**, 1095–1108 (2017).
87. DeWitt JC, Rockwell CE, Bowman CC. Immunotoxicity Testing methods and protocols. *Methods in Molecular Biology* **1803**, doi: 10.1007/978-1-4939-8549-4 (2018).

Bibliografia

88. Felger JC. Imaging the role of inflammation in mood and anxiety-related disorders. *Current Neuropharmacology* **16**, 533–558 (2018).
89. Shirazi LF, Bissett J, Romeo F, Mehta JL. Role of Inflammation in Heart Failure. *Current Atherosclerosis Reports* **19**, doi: 10.1007/s11883-017-0660-3 (2017).
90. Prangsaengtong O, Jantaree P, Lirdprapamongkol K, Ngiswara L, Svasti J, Koizumi K. Aspirin suppresses components of lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodeling by inhibiting the NF- κ B/VCAM-1 pathway in human lymphatic endothelial cells. *Vascular Medicine* **23**, 201–211 (2018).
91. Huang WC, Wu LY, Hu S, W. S. Spilanthol Inhibits COX-2 and ICAM-1 Expression via Suppression of NF- κ B and MAPK Signaling in Interleukin-1 β -Stimulated Human Lung Epithelial Cells. *Inflammation* **41**, 1934–1944 (2018).
92. Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C, Naidoo A, Szamosi JC, Verschoor CP, Loukov D, Schenck LP, Jury J, Foley KP, Schertzer JD, Larché MJ, Davidson DJ, Verdú EF, Surette MG, Bowdish DME. Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. *Cell Host and Microbe* **21**, 455–466 (2017).
93. Van den Bossche J, O'Neill LA, Menon D. Macrophage Immunometabolism: Where Are We (Going)? *Trends in Immunology* **38**, 395–406 (2017).
94. Elgazar AA, Knany HR, Ali MS. Insights on the molecular mechanism of anti-inflammatory effect of formula from Islamic traditional medicine: An in-silico study. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* **9**, 353–363 (2019).
95. Yamada K, Yamaguchi K, Yoshimura S, Terauchi A, Kawasaki T. Conservation of chitin-induced MAPK signaling pathways in rice and arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **58**, 993–1002 (2017).
96. Qi F, Bai S, Wang D, Xu L, Hu H, Zeng S, Chai R, Liu B. Macrophages produce IL-33 by activating MAPK signaling pathway during RSV infection. *Molecular Immunology* **87**, 284–292 (2017).
97. Liu Y, He C. A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox Biology* **11**, 192–204 (2017).
98. Zou X, Blank M. Targeting p38 MAP kinase signaling in cancer through post-translational modifications. *Cancer Letters* **384**, 19–26 (2017).
99. Corre I, Paris F, Huot J. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. *Oncotarget* **8**, 55684–55714 (2017).
100. Gkouveris I, Nikitakis NG. Role of JNK signaling in oral cancer: A mini review. *Tumor Biology* **39**, doi: 10.1177/1010428317711659 (2017).

101. Tanimura S, Takeda K. ERK signalling as a regulator of cell motility. *Journal of Biochemistry* **162**, 145–154 (2017).
102. Huang X, Liu G, Guo J, Su Zheng Quan. The PI3K/AKT pathway in obesity and type 2 diabetes. *International Journal of Biological Sciences* **14**, 1483–1496 (2018).
103. Koundouros N, Poulogiannis G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt signaling and redox metabolism in cancer. *Frontiers in Oncology* **8**, doi: 10.3389/fonc.2018.00160 (2018).
104. Mendes KL, Lelis DF, Santos SHS. Nuclear sirtuins and inflammatory signaling pathways. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **38**, 98–105 (2017).
105. Chen Z, Gong L, Zhang P, Li Y, Liu B, Zhang L, Zhuang J, Xiao D. Epigenetic Down-Regulation of Sirt 1 via DNA Methylation and Oxidative Stress Signaling Contributes to the Gestational Diabetes Mellitus-Induced Fetal Programming of Heart Ischemia-Sensitive Phenotype in Late Life. *International journal of biological sciences* **15**, 1240–1251 (2019).
106. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy* **2**, doi:10.1038/sigtrans.2017.23 (2017).
107. Haghi Aminjan H, Abtahi SR, Hazrati E, Chamanara M, Jalili M, Paknejad B. Targeting of oxidative stress and inflammation through ROS/NF-kappaB pathway in phosphine-induced hepatotoxicity mitigation. *Life Sciences* **232**, doi: 10.1016/j.lfs.2019.116607 (2019).
108. Iminger-Finger Irmgard, Kargul Joanna, Laurent GJ. Diabetes: Present and future. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **88**, 196 (2017).
109. Riddle MC. Diabetes Care American diabetes association standar of medical care in diabetes 2018. *The Journal of Cinical and Applied Research and Education* **41**, 1–172 (2018).
110. Ravnic DJ, Leberfinger AN, Ozbolat IT. Bioprinting and Cellular Therapies for Type 1 Diabetes. *Trends in Biotechnology* **35**, 1025–1034 (2017).
111. Dogruel H, Balci MK. Development of therapeutic options on type 2 diabetes in years: Glucagon-like peptide-1 receptor agonist's role intreatment; from the past to future. *World Journal of Diabetes* **10**, 446–453 (2019).
112. Gudjinu HY, Sarfo B. Risk factors for type 2 diabetes mellitus among out-patients in Ho, the Volta regional capital of Ghana: A case-control study. *BMC Research Notes* **10**, doi: 10.1186/s13104-017-2648-z (2017).
113. Law KP, Zhang H. The pathogenesis and pathophysiology of gestational diabetes mellitus: Deductions from a three-part longitudinal metabolomics study in China. *Clinica Chimica Acta* **468**, 60–70 (2017).

Bibliografia

114. Chiefari E, Arcidiacono B, Foti D, Brunetti A. Gestational diabetes mellitus: an updated overview. *Journal of Endocrinological Investigation* **40**, 899–909 (2017).
115. Hattersley AT, P. K. Precision diabetes: learning from monogenic diabetes. *Diabetologia* **60**, 769–777 (2017).
116. Titchenell PM, Lazar MA, Birnbaum MJ. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **28**, 497–505 (2017).
117. Shastri AA, Hegde V, Peddibhotla S, Feizy Z, Dhurandhar NV. E4orf1: A protein for enhancing glucose uptake despite impaired proximal insulin signaling. *PLoS ONE* **13**, doi: 10.1371/journal.pone.0208427 (2018).
118. Patel P, Woodgett JR. Glycogen Synthase Kinase 3: A Kinase for All Pathways? *Current Topics in Developmental Biology* **123**, 277–302 (2017).
119. Lee S, Don HH. FoxO integration of insulin signaling with glucose and lipid metabolism. *The Journal of Endocrinology* **233**, 67–79 (2018).
120. MA, Kalwat, Cobb MH. Mechanisms of the amplifying pathway of insulin secretion in the β cell. *Pharmacology and Therapeutics* **179**, 17–30 (2017).
121. Boland BB, Rhodes CJ, Grimsby JS. The dynamic plasticity of insulin production in β -cells. *Molecular Metabolism* **6**, 958–973 (2017).
122. Wu T, Qiao S, Shi C, Wang S, Ji G. Metabolomics window into diabetic complications. *Journal of Diabetes Investigation* **9**, 244–255 (2018).
123. Landau Z, Raz I, Wainstein J, Bar-Dayana Y, Cahn A. The role of insulin pump therapy for type 2 diabetes mellitus. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews* **33**, doi: 10.1002/dmrr.2822 (2017).
124. Di Lullo L, Mangano M, Ronco C, Barbera V, De Pascalis A, Bellasi A, Russo D, Di Iorio B, Cozzolino M. The treatment of type 2 diabetes mellitus in patients with chronic kidney disease: What to expect from new oral hypoglycemic agents. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews* **11**, 295–305 (2017).
125. Wang X, Garrett MR. Nephron number, hypertension, and CKD: Physiological and genetic insight from humans and animal models. *Physiological Genomics* **49**, 180–192 (2017).
126. Oxburgh L. Kidney Nephron Determination. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **34**, 427–450 (2018).
127. Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: Challenges, progress, and possibilities. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* **13**, doi: 10.2215/CJN.11491116 (2017).

128. Ioannou K. Diabetic nephropathy: Is it always there? assumptions, weaknesses and pitfalls in the diagnosis. *Hormones* **16**, 351–361 (2017).
129. Van Krieken R, Krepinsky JC. Caveolin-1 in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy: Potential Therapeutic Target? *Current Diabetes Reports* **17**, doi: 10.1007/s11892-017-0844-9 (2017).
130. Nagib AM, Elsayed Matter Y, Gheith OA, Refaie AF, Othman NF, Al-Otaibi T. Diabetic nephropathy following posttransplant diabetes mellitus. *Experimental and Clinical Transplantation* **17**, 138–146 (2019).
131. Xu H, Carrero JJ. Insulin resistance in chronic kidney disease. *Nephrology* **22**, 31–34 (2017).
132. Bacakova L, Travnickova M, Filova E, Matějka R, Stepanovska J, Musilkova J, Zarubova J, Molitor M. The Role of Vascular Smooth Muscle Cells in the Physiology and Pathophysiology of Blood Vessels. *Muscle Cell and Tissue - Current Status of Research Field* **12**, 229–257 (2018).
133. Abdala-Valencia H, Kountz TS, Marchese ME, Cook-Mills JM. VCAM-1 induces signals that stimulate ZO-1 serine phosphorylation and reduces ZO-1 localization at lung endothelial cell junctions. *Journal of Leukocyte Biology* **104**, 215–228 (2018).
134. Cai H, Yao Z, Li W. IRF-5 accelerates leukocyte adhesion to endothelial cells in ischemia-reperfusion injury through regulating the transcription of VCAM-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **492**, 192–198 (2017).
135. Kikuchi R, Ambe K, Kon H, Takada S, Watanabe H. Nitric Oxide Synthase (NOS) Isoform Expression after Peripheral Nerve Transection in Mice. *The Bulletin of Tokyo Dental College* **59**, 15–25 (2018).
136. Sattler S, Kennedy-Lydon T. The Immunology of Cardiovascular Homeostasis and Pathology. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **1003**, doi: 10.1007/978-3-319-57613-8 (2017).
137. Heitmar R, Lip GYH, Ryder RE, Blann AD. Retinal vessel diameters and reactivity in diabetes mellitus and/or cardiovascular disease. *Cardiovascular Diabetology* **16**, doi: 10.1186/s12933-017-0534-6 (2017).
138. Campesi I, Franconi F, Seghieri G, Meloni M. Sex-gender-related therapeutic approaches for cardiovascular complications associated with diabetes. *Pharmacological Research* **119**, 195–207 (2017).
139. Aroor AR, Jia G, Sowers JR. Cellular mechanisms underlying obesity-induced arterial stiffness. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **314**, 387–398 (2018).
140. Strain WD, Paldánus PM. Diabetes, cardiovascular disease and the microcirculation. *Cardiovascular Diabetology* **17**, doi: 10.1186/s12933-018-0703-2 (2018).

Bibliografia

141. Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological Reviews* **279**, 70–89 (2017).
142. Shi N, Li N, Duan X, Niu H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research* **4**, doi: 10.1186/s40779-017-0122-9 (2017).
143. Schilling E, Weiss R, Grahner A, Bitar M, Sack U, Hauschildt S. Molecular mechanism of LPS-induced TNF- α biosynthesis in polarized human macrophages. *Molecular Immunology* **93**, 206–215 (2018).
144. Cukrowska B, Sowińska A, Bierła JB, Czarnowska E, Rybak A, Grzybowska-Chlebowczyk U. Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota - Key players in the pathogenesis of celiac disease. *World Journal of Gastroenterology* **23**, 7505–7518 (2017).
145. Sun M, Wu W, Liu Z, Cong Y. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. *Journal of Gastroenterology* **52**, 1–8 (2017).
146. Hu J, Lin S, Zheng B, C. P. C. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **58**, 1243–1249 (2018).
147. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* **474**, 1823–1836 (2017).
148. Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunology* **18**, 1–25 (2017).
149. Priyadarshini M, Navarro, G, Layden BT. Gut microbiota: FFAR reaching effects on islets. *Endocrinology* **159**, 2495–2505 (2018).
150. Milligan G, Kimura I. Free Fatty Acid Receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology* **236**, doi: 10.1007/978-3-319-50693-7 (2017).
151. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïs CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology* **17**, 219–232 (2017).
152. Sabatino A, Regolisti G, Cosola C, Gesualdo L, Fiaccadori E. Intestinal Microbiota in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease. *Current Diabetes Reports* **17**, doi: 10.1007/s11892-017-0841-z (2017).
153. Singh DP, Singh J, Boparai RK, Zhu J, Mantri S, Khare P, Khardori R, Kondepudi KK, Chopra K, Bishnoi M. Isomalto-oligosaccharides, a prebiotic, functionally augment green tea effects against high fat diet-induced metabolic alterations via preventing gut dysbacteriosis in mice. *Pharmacological Research* **123**, 103–113 (2017).
154. Lin R, He X, Chen H, He Q, Yao Z, Li Y, Yang H, Simpson S Jr. Oil tea improves glucose and lipid levels and alters gut microbiota in type 2 diabetic mice. *Nutrition Research* **57**, 67–77 (2018).

155. Lyu M, Wang YF, Fan GW, Wang XY, Xu SY, Zhu Y. Balancing herbal medicine and functional food for prevention and treatment of cardiometabolic diseases through modulating gut microbiota. *Frontiers in Microbiology* **8**, doi: 10.3389/fmicb.2017.02146 (2017).
156. Marques FZ, Nelson E, Chu PY, Horlock D, Fiedler A, Ziemann M, Tan JK, Kuruppu S, Rajapakse NW, El-Osta A, Mackay CR, Kaye DM. High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice. *Circulation* **135**, 964–977 (2017).
157. Tuenter E, Foubert K, Pieters L. Mood Components in Cocoa and Chocolate: The Mood Pyramid. *Planta Medica* **84**, 839–844 (2018).
158. Rawel HM, Huschek G, Sagu ST, Homann T. Cocoa bean proteins-Characterization, changes and modifications due to ripening and post-harvest processing. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11020428 (2019).
159. Di Mattia CD, Sacchetti G, Mastrocola D, Serafini M. From cocoa to chocolate: The impact of processing on in vitro antioxidant activity and the effects of chocolate on antioxidant markers in vivo. *Frontiers in Immunology* **8**, 1–7 (2017).
160. Cavarretta E, Peruzzi M, Del Vescovo R, Di Pilla F, Gobbi G, Serdoz A, Ferrara R, Schirone L, Sciarretta S, Nocella C, De Falco E, Schiavon S, Biondi-Zoccai G, Frati G, Carnevale R. Dark chocolate intake positively modulates redox status and markers of muscular damage in elite football athletes: A randomized controlled study. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **21**, doi: 10.1155/2018/4061901 (2018).
161. Decroix L, Soares DD, Meeusen R, Heyman E, Tonoli C. Cocoa Flavanol Supplementation and Exercise: A Systematic Review. *Sports Medicine* **48**, 867–892 (2018).
162. Ramos S, Martín MÁ, Goya L. Effects of cocoa antioxidants in type 2 diabetes mellitus. *Antioxidants* **6**, doi:10.3390/antiox6040084 (2017).
163. Leyva-Soto A, Chavez-Santoscoy RA, Lara-Jacobo LR, Chavez-Santoscoy AV, Gonzalez-Cobian LN. Daily consumption of chocolate rich in flavonoids decreases cellular genotoxicity and improves biochemical parameters of lipid and glucose metabolism. *Molecules* **23**, doi:10.3390/molecules23092220 (2018).
164. Magrone T, Russo MA, Jirillo E. Cocoa and dark chocolate polyphenols: From biology to clinical applications. *Frontiers in Immunology* **8**, doi: 10.3389/fimmu.2017.00677 (2017).
165. Jaramillo Flores ME. Cocoa flavanols: Natural agents with attenuating effects on metabolic syndrome risk factors. *Nutrients* **11**, doi:10.3390/nu11040751 (2019).

Bibliografía

166. Ludovici V, Barthelmes, J, Nägele MP, Enseleit F, Ferri C, Flammer AJ, Ruschitzka F, Sudano I. Cocoa, blood pressure, and vascular function. *Current Hypertension Reports* **4**, doi: 10.3389/fnut.2017.00036 (2017).
167. Martín MÁ, Goya L, Ramos S. Preventive Effects of Cocoa and Cocoa Antioxidants in Colon Cancer. *Diseases* **4**, 6 (2016).
168. Camandola S, Plick N, Mattson MP. Impact of Coffee and Cacao Purine Metabolites on Neuroplasticity and Neurodegenerative Disease. *Neurochemical Research* **44**, 214–227 (2019).
169. Vargas F, Romecín P, García-Guillén AI, Wangesteen R, Vargas-Tendero P, Paredes MD, Atucha NM, García-Estaño J. Flavonoids in kidney health and disease. *Frontiers in Physiology* **9**, doi: 10.3389/fphys.2018.00394 (2018).
170. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiological Reviews* **93**, 137–188 (2013).
171. Martín, MÁ, Goya L, Ramos S. Antidiabetic actions of cocoa flavanols. *Molecular Nutrition and Food Research* **60**, 1756–1769 (2016).
172. Monagas M, Urpi-Sarda M, Sánchez-Patán F, Llorach R, Garrido I, Gómez-Cordovés C, Andres-Lacueva C, Bartolomé B. Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food and Function* **1**, 233–253 (2010).
173. Blancas-Benitez FJ, Pérez-Jiménez J, Montalvo-González E, González-Aguilar GA, Sáyago-Ayerdi SG. In vitro evaluation of the kinetics of the release of phenolic compounds from guava (*Psidium guajava* L.) fruit. *Journal of Functional Foods* **43**, 139–145 (2018).
174. Vinson JA, Proch J, Bose P, Muchler S, Taffera P, Shuta D, Samman N, Agbor GA. Chocolate is a powerful ex vivo and in vivo antioxidant, an antiatherosclerotic agent in an animal model, and a significant contributor to antioxidants in the European and American diets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 8071–8076 (2006).
175. Perez-Vizcaino F, Bishop-Bailley D, Lodi F, Duarte J, Cogolludo A, Moreno L, Bosca L, Mitchell JA, Warner TD. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **346**, 919–925 (2006).
176. Zhu D, Wang L, Zhou Q, Yan S, Li Z, Sheng J, Zhang W. (+)-Catechin ameliorates diabetic nephropathy by trapping methylglyoxal in type 2 diabetic mice. *Molecular Nutrition and Food Research* **58**, 2249–2260 (2014).

177. Fang Q, Zhao L, Wang Y, Zhang Y, Li Z, Pan Y, Kanchana K, Wang J, Tong C, Li D, Liang G. A novel chalcone derivative attenuates the diabetes-induced renal injury via inhibition of high glucose-mediated inflammatory response and macrophage infiltration. *Toxicology and Applied Pharmacology* **282**, 129–138 (2015).
178. Zhang X, Liang D, Lian X, Jiang Y, He H, Liang W, Zhao Y, Chi ZH. Berberine activates Nrf2 nuclear translocation and inhibits apoptosis induced by high glucose in renal tubular epithelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. *Apoptosis* **21**, 721–736 (2016).
179. Hou S, Zheng F, Li Y, Gao L, Zhang J. The protective effect of glycyrrhizic acid on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose. *International Journal of Molecular Sciences* **15**, 15026–15043 (2014).
180. Mitrakou A. Kidney: Its impact on glucose homeostasis and hormonal regulation. *Diabetes Research and Clinical Practice* **93**, S66–S72 (2011).
181. Tiwari S, Singh RS, Li L, Tsukerman S, Godbole M, Pandey G, Ecelbarger CM. Deletion of the insulin receptor in the proximal tubule promotes hyperglycemia. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**, 1209–1214 (2013).
182. Mollica A, Zengin G, Locatelli M, Stefanucci A, Macedonio G, Bellagamba G, Onaolapo O, Onaolapo A, Azeez F, Ayileka A, Novellino E. An assessment of the nutraceutical potential of *Juglans regia* L. leaf powder in diabetic rats. *Food and Chemical Toxicology* **107**, 554–564 (2017).
183. Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, Smith CD, Hong G, Brown J. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes. *Diabetes* **54**, 3427–3434 (2005).
184. Norton L, Shannon CE, Fourcaudot M, Hu C, Wang N, Ren W, Song J, Abdul-Ghani M, DeFronzo RA, Ren J, Jia W. Sodium-glucose co-transporter (SGLT) and glucose transporter (GLUT) expression in the kidney of type 2 diabetic subjects. *Diabetes, Obesity and Metabolism* **19**, 1322–1326 (2017).
185. Jaikumkao K, Pongchaidecha A, Chatsudthipong V, Chattipakorn SC, Chattipakorn N, Lungkaphin A. The roles of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in preventing kidney injury in diabetes. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **94**, 176–187 (2017).
186. Blaschek W. Natural Products as Lead Compounds for Sodium Glucose Cotransporter (SGLT) Inhibitors. *Planta Medica* **83**, 985–993 (2017).
187. Jiang M, Wang Q, Karasawa T, Koo JW, Li H, Steyger PS. Sodium-glucose transporter-2 (SGLT2; SLC5A2) enhances cellular uptake of aminoglycosides. *PLoS ONE* **9**, doi: 10.1371/journal.pone.0108941 (2014).

Bibliografía

188. Panchapakesan U, Pegg K, Gross S, Komala MG, Mudaliar H, Forbes J, Pollock C, Mather A. Effects of SGLT2 Inhibition in Human Kidney Proximal Tubular Cells-Renoprotection in Diabetic Nephropathy? *PLoS ONE* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0054442 (2013).
189. Han S, Hagan DL, Taylor JR, Xin L, Meng W, Biller SA, Wetterau JR, Washburn WN, Whaley JM. Dapagliflozin, a Selective SGLT2 Inhibitor, Improves Glucose Homeostasis in Normal and Diabetic Rats. *Insulin* **57**, 1723–1729 (2008).
190. Artunc F, Schleicher E, Weigert C, Fritsche A, Stefan N, Häring HU. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature. *Nature Reviews Nephrology* **12**, 721–737 (2016).
191. Huang PL, Chi CW, Liu TY. Areca nut procyanidins ameliorate streptozocin-induced hyperglycemia by regulating gluconeogenesis. *Food and Chemical Toxicology* **55**, 137–143 (2013).
192. Anand P, Murali KY, Tandon V, Murthy PS, Chandra R. Insulinotropic effect of cinnamaldehyde on transcriptional regulation of pyruvate kinase, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and GLUT4 translocation in experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* **186**, 72–81 (2010).
193. Winiarska K, Grabowski M, Rogacki MK. Inhibition of renal gluconeogenesis contributes to hypoglycaemic action of NADPH oxidase inhibitor, apocynin. *Chemico-Biological Interactions* **189**, 119–126 (2011).
194. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Bravo L, Goya L, Ramos S. Cocoa flavonoids attenuate high glucose-induced insulin signalling blockade and modulate glucose uptake and production in human HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology* **64**, 10–19 (2014).
195. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Escrivá F, Álvarez C, Goya L, Ramos S. Cocoa-rich diet ameliorates hepatic insulin resistance by modulating insulin signaling and glucose homeostasis in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **26**, 704–712 (2015).
196. Diaz-Gerevini GT, Repossi G, Dain A, Tarres MC, Das UN, Eynard AR. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition* **32**, 174–178 (2016).
197. Nyane NA, Tlaila TB, Malefane TG, Ndwandwe DE, Owira PMO. Metformin-like antidiabetic, cardio-protective and non-glycemic effects of naringenin: Molecular and pharmacological insights. *European Journal of Pharmacology* **803**, 103–111 (2017).
198. Yang CS, Zhang J, Zhang L, Huang J, Wang Y. Mechanisms of Body Weight Reduction and Metabolic Syndrome Alleviation by Tea. *Molecular Nutrition and Food Research* **60**, 160–174 (2016).

199. Huang CN, Wang CJ, Yang YS, Lin CL, Peng CH. Hibiscus sabdariffa polyphenols prevent palmitate-induced renal epithelial mesenchymal transition by alleviating dipeptidyl peptidase-4-mediated insulin resistance. *Food and Function* **7**, 475–482 (2016).
200. Hu QH, Zhang X, Pan Y, Li YC, K. L. Allopurinol, quercetin and rutin ameliorate renal NLRP3 inflammasome activation and lipid accumulation in fructose-fed rats. *Biochemical Pharmacology* **84**, 113–125 (2012).
201. Montagut G, Bladé C, Blay M, Fernández-Larrea J, Pujadas G, Salvadó MJ, Arola L, Pinent M, Ardévol A. Effects of a grapeseed procyanidin extract (GSPE) on insulin resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry* **21**, 961–967 (2010).
202. Hao J, Liu S, Zhao S, Liu Q, Lv X, Chen H, Niu Y, Duan H. PI3K/Akt pathway mediates high glucose-induced lipogenesis and extracellular matrix accumulation in HKC cells through regulation of SREBP-1 and TGF- β 1. *Histochemistry and Cell Biology* **135**, 173–181 (2011).
203. Lee YJ, Han HJ. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3 β , Snail1, and β -catenin in renal proximal tubule cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **298**, 1263–1275 (2010).
204. Mariappan MM, Prasad S, D'Silva K, Cedillo E, Sataranatarajan K, Barnes JL, Choudhury GG, Kasinath BS. Activation of glycogen synthase kinase 3 β ameliorates diabetes-induced kidney injury. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 35363–35375 (2014).
205. Renno WM, Abdeen S, Alkhalaf M, Asfar S. Effect of green tea on kidney tubules of diabetic rats. *British Journal of Nutrition* **100**, 652–659 (2008).
206. Lee MJ, Feliars D, Mariappan MM, Sataranatarajan K, Mahimainathan L, Musi N, Foretz M, Viollet B, Weinberg JM, Choudhury GG, Kasinath BS. A role for AMP-activated protein kinase in diabetes-induced renal hypertrophy. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **292**, 617–627 (2007).
207. Chang CC, Chang CY, Wu YT, Huang JP, Yen TH, Hung LM. Resveratrol retards progression of diabetic nephropathy through modulations of oxidative stress, proinflammatory cytokines, and AMP-activated protein kinase. *Journal of Biomedical Science* **18**, doi: 10.1186/1423-0127-18-47 (2011).
208. Shrikanth CB, Chilkunda ND. Zerumbone Ameliorates High Glucose-Induced Reduction in AMP-Activated Protein Kinase Phosphorylation in Tubular Kidney Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**, 9208–9216 (2017).
209. Liu HW, Wei CC, Chang SJ. Low-molecular-weight polyphenols protect kidney damage through suppressing NF- κ B and modulating mitochondrial biogenesis in diabetic: Db / db mice. *Food and Function* **7**, 1941–1949 (2016).

Bibliografía

210. Rotte A, Pasham V, Eichenmüller M, Bhandaru M, Föller M, Lang F. Upregulation of Na⁺/H⁺ exchanger by the AMP-activated protein kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **398**, 677–682 (2010).
211. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Bravo L, Goya L, Ramos S. Cocoa flavonoids improve insulin signalling and modulate glucose production via AKT and AMPK in HepG2 cells. *Molecular Nutrition and Food Research* **57**, 974–985 (2013).
212. Prasad RC, Herzog B, Boone B, Sims L, Waltner-Law M. An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes. *Journal of Ethnopharmacology* **96**, 295–301 (2005).
213. Lieberthal W, Tang M, Lusco M, Abate M, Levine JS. Preconditioning mice with activators of AMPK ameliorates ischemic acute kidney injury in vivo. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **311**, 731–739 (2016).
214. Sato T, Toyoshima A, Hiraki T, Ohta Y, Katayama K, Arai T, Tazaki H. Effects of metformin on plasma concentrations of glucose and mannose, g6pase and pepck activity, and mrna expression in the liver and kidney of chickens. *British Poultry Science* **52**, 273–277 (2011).
215. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Goya L, Ramos S. Cocoa intake ameliorates hepatic oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. *Food Research International* **69**, 194–201 (2015).
216. Stanton RC. Oxidative stress and diabetic kidney disease. *Current Diabetes Reports* **11**, 330–336 (2011).
217. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods* **18**, 820–897 (2015).
218. Fernández-Millán E, Ramos S, Alvarez C, Bravo L, Goya L, Martín MÁ. Microbial phenolic metabolites improve glucose-stimulated insulin secretion and protect pancreatic beta cells against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity via ERKs and PKC pathways. *Food and Chemical Toxicology* **66**, 245–253 (2014).
219. Quine SD, Raghu PS. Effects of (-)-epicatechin, a flavonoid on lipid peroxidation and antioxidants in streptozotocin-induced diabetic liver, kidney and heart. *Pharmacological Reports* **57**, 610–615 (2005).
220. Zhang W, Miao J, Wang S, Zhang Y. The Protective Effects of Beta-Casomorphin-7 against Glucose -Induced Renal Oxidative Stress In Vivo and Vitro. *PLoS ONE* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0063472 (2013).

221. Figueroa-Pérez MG, Pérez-Ramírez IF, Enciso-Moreno, JA, Gallegos-Corona MA, Salgado, LM, Reynoso-Camacho R. Diabetic nephropathy is ameliorated with peppermint (*Mentha piperita*) infusions prepared from salicylic acid-elicited plants. *Journal of Functional Foods* **43**, 55–61 (2018).
222. Cordero-Herrera I, Martín MÁ, Bravo L, Goya L, Ramos S. Cocoa flavonoids protect hepatic cells against high-glucose-induced oxidative stress: Relevance of MAPKs. *Molecular Nutrition and Food Research* **59**, 597–609 (2015).
223. Prince PSM. (-) Epicatechin attenuates mitochondrial damage by enhancing mitochondrial multi-marker enzymes, Adenosine triphosphate and lowering calcium in isoproterenol induced myocardial infarcted rats. *Food and Chemical Toxicology* **53**, 409–416 (2013).
224. Vranješ M, Popović BM, Štajner D, Ivetić V, Mandić A, Vranješ D. Effects of bearberry, parsley and corn silk extracts on diuresis, electrolytes composition, antioxidant capacity and histopathological features in mice kidneys. *Journal of Functional Foods* **21**, 272–282 (2016).
225. Li, D, Zhao T, Meng J, Jing Y, Jia F, He P. Procyanidin B2 inhibits high glucose induced Epithelial mesenchymal transition in HK-2 human renal proximal tubular epithelial cells. *Molecular Medicine Reports* **12**, 8148–8154 (2015).
226. Malik S, Suchal K, Khan SI, Bhatia J, Kishore K, Dinda AK, Arya DS. Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-NF- κ B-TNF- α and TGF- β 1-MAPK-fibronectin pathways. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **313**, 414–422 (2017).
227. Pan Y, Zhu G, Wang Y, Cai L, Cai Y, Hu J, Li Y, Yan Y, Wang Z, Li X, Wei T, Liang G. Attenuation of high-glucose-induced inflammatory response by a novel curcumin derivative B06 contributes to its protection from diabetic pathogenic changes in rat kidney and heart. *Journal of Nutritional Biochemistry* **24**, 146–155 (2013).
228. Yang XH, Pan Y, Zhan XL, Zhang BL, Guo LL, Jin HM. Epigallocatechin-3-gallate Attenuates Renal Damage by Suppressing Oxidative Stress in Diabetic db/db Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2016**, doi: 10.1155/2016/2968462 (2016).
229. Qi W, Niu J, Qin Q, Qiao Z, Gu Y. Glycated albumin triggers fibrosis and apoptosis via an NADPH oxidase/Nox4-MAPK pathway-dependent mechanism in renal proximal tubular cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **405**, 74–83 (2015).
230. Sedeek M, Montezano AC, Hebert RL, Gray SP, Di Marco E, Jha JC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Schiffrin EL, Wilkinson-Berka JL, Touyz RM. Oxidative stress, nox isoforms and complications of diabetes-potential targets for novel therapies. *Journal of Cardiovascular Translational Research* **5**, 509–518 (2012).

Bibliografía

231. Papadimitriou A, Peixoto EB, Silva KC, Lopes de Faria JM, Lopes de Faria JB. Increase in AMPK brought about by cocoa is renoprotective in experimental diabetes mellitus by reducing NOX4/TGF β -1 signaling. *Journal of Nutritional Biochemistry* **25**, 773–784 (2014).
232. Shimizu H, Saito S, Higashiyama Y, Nishijima F, Niwa T. CREB, NF- κ B, and NADPH oxidase coordinately upregulate indoxyl sulfate-induced angiotensinogen expression in proximal tubular cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **304**, 685–692 (2013).
233. Yong R, Chen XM, Shen S, Vijayaraj S, Ma Q, Pollock CA, Saad S. Plumbagin Ameliorates Diabetic Nephropathy via Interruption of Pathways that Include NOX4 Signalling. *PLoS ONE* **8**, doi: 10.1371/journal.pone.0073428 (2013).
234. Zhang J, Yang S, Li H, Chen F, Shi J. Naringin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting NADPH oxidase 4. *European Journal of Pharmacology* **804**, 1–6 (2017).
235. Jeong BY, Lee HY, Park CG, Kang J, Yu SL, Choi DR, Han SY, Park MH, Cho S, Lee SY, Hwang WM, Yun SR, Ryu HM, Oh EJ, Park SH, Kim YL, Yoon SH. Oxidative stress caused by activation of NADPH oxidase 4 promotes contrast-induced acute kidney injury. *PLoS ONE* **13**, 1–22 (2018).
236. Hao CM, Haase VH. Sirtuins and their relevance to the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**, 1620–1627 (2010).
237. Huang YT, Chen YY, Lai YH, Cheng CC, Lin TC, Su YS, Liu CH, Lai PC. Resveratrol alleviates the cytotoxicity induced by the radiocontrast agent, ioxitalamate, by reducing the production of reactive oxygen species in HK-2 human renal proximal tubule epithelial cells in vitro. *International Journal of Molecular Medicine* **37**, 83–91 (2016).
238. Li X, Cai W, Lee K, Liu B, Deng Y, Chen Y, Zhang X, He JC, Zhong Y. Puerarin attenuates diabetic kidney injury through the suppression of NOX4 expression in podocytes. *Scientific Reports* **7**, doi:10.1038/s41598-017-14906-8 (2017).
239. Rabadan-Chávez G, Quevedo-Corona L, Garcia AM, Reyes-Maldonado E, Jaramillo-Flores ME. Cocoa powder, cocoa extract and epicatechin attenuate hypercaloric diet-induced obesity through enhanced β -oxidation and energy expenditure in white adipose tissue. *Journal of Functional Foods* **20**, 54–67 (2016).
240. Bao L, Cai X, Zhang Z, Li Y. Grape seed procyanidin B2 ameliorates mitochondrial dysfunction and inhibits apoptosis via the AMP-Activated protein kinase-silent mating type information regulation 2 homologue 1-PPAR γ co-Activator-1 α axis in rat mesangial cells under high-dose glucosami. *British Journal of Nutrition* **113**, 35–44 (2015).

241. Persson F, Rossing P. Diagnosis of diabetic kidney disease: state of the art and future perspective. *Kidney International Supplements* **8**, 2–7 (2018).
242. Homas MC, Brownlee M, Susztak K, Sharma K, Jandeleit-Dahm KA, Zoungas S, Rossing P, Groop PH, Cooper ME. Diabetic kidney disease. *Nature Reviews* **1**, doi: 10.1038/nrdp.2015.18 (2015).
243. Costa C, Tsatsakis A, Mamoulakis C, Teodoro M, Briguglio G, Caruso E, Tsoukalas D, Margina D, Dardiotis E, Kouretas D, Fenga C. Current evidence on the effect of dietary polyphenols intake on chronic diseases. *Food and Chemical Toxicology* **110**, 286–299 (2017).
244. Grassi D, Desideri G, Necozione S, Lippi C, Casale R, Properzi G, Blumberg JB, Ferri C. Blood Pressure Is Reduced and Insulin Sensitivity Increased in Glucose-Intolerant, Hypertensive Subjects after 15 Days of Consuming High-Polyphenol Dark Chocolate. *The Journal of Nutrition* **138**, 1671–1676 (2008).
245. Jalil AM, Ismail A, Pei CP, Hamid M, Kamaruddin SH. Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 7877–7884 (2008).
246. Ruzaidi A, Amin I, Nawalyah AG, Hamid M, Faizul HA. The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* **98**, 55–60 (2005).
247. Tiwari S, Halagappa VK, Riazi S, Hu X, Ecelbarger CA. Reduced expression of insulin receptors in the kidneys of insulin-resistant rats. *Journal of the American Society of Nephrology* **18**, 2661–2671 (2007).
248. Leonard B, Watson RN, Loomes KM, Phillips AR, Cooper GJ. Insulin resistance in the Zucker diabetic fatty rat: A metabolic characterisation of obese and lean phenotypes. *Acta Diabetologica* **42**, 162–170 (2005).
249. Baynes J, Murray DB. Cardiac and renal function are progressively impaired with aging in Zucker diabetic fatty type II diabetic rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 328–334 (2009).
250. Nakayama T, Kosugi T, Gersch M, Connor T, Sanchez-Lozada LG, Lanaspa MA, Roncal C, Perez-Pozo SE, Johnson RJ, Nakagawa T. Dietary fructose causes tubulointerstitial injury in the normal rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **298**, 712–720 (2010).
251. Muthenna P, Raghu G, Kumar PA, Surekha MV, Reddy GB. Effect of cinnamon and its procyanidin-B2 enriched fraction on diabetic nephropathy in rats. *Chemico-Biological Interactions* **222**, 68–76 (2014).

Bibliografía

252. Dorenkott MR, Griffin LE, Goodrich KM, Thompson-Witrick KA, Fundaro G, Ye L, Stevens JR, Ali M, O'Keefe SF, Hulver MW, Neilson AP. Oligomeric cocoa procyanidins possess enhanced bioactivity compared to monomeric and polymeric cocoa procyanidins for preventing the development of obesity, insulin resistance, and impaired glucose tolerance during high-fat feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **62**, 2216–2227 (2014).
253. Cohen MP, Clements RS, Cohen JA, Shearman CW. Prevention of decline in renal function in the diabetic db/db mouse. *Diabetologia* **39**, 270–274 (1996).
254. Hasegawa K, Wakino S, Simic P, Sakamaki Y, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Kanda T, Kubota E, Tokuyama H, Hayashi K, Guarente L, Itoh H. Renal tubular sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing claudin-1 overexpression in podocytes. *Nature Medicine* **19**, 1496–1504 (2013).
255. Almoosawi S, Fyfe L, Ho C, Al-Dujaili E. The effect of polyphenol-rich dark chocolate on fasting capillary whole blood glucose, total cholesterol, blood pressure and glucocorticoids in healthy overweight and obese subjects. *British Journal of Nutrition* **103**, 842–850 (2010).
256. Zhang Z, Li BY, Li XL, Cheng M, Yu F, Lu WD, Cai Q, Wang JF, Zhou RH, Gao HQ, Shen L. Proteomic analysis of kidney and protective effects of grape seed procyanidin B2 in db/db mice indicate MFG-E8 as a key molecule in the development of diabetic nephropathy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* **1832**, 805–816 (2013).
257. Eid A, Bodin S, Ferrier B, Delage H, Boghossian M, Martin M, Baverel G, Conjard A. Intrinsic gluconeogenesis is enhanced in renal proximal tubules of Zucker diabetic fatty rats. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 398–405 (2006).
258. Gatica R, Bertinat R, Silva P, Carpio D, Ramírez MJ, Slebe JC, San Martín R, Nualart F, Campistol JM, Caelles C, Yáñez AJ. Altered expression and localization of insulin receptor in proximal tubule cells from human and rat diabetic kidney. *Journal of Cellular Biochemistry* **114**, 639–649 (2013).
259. Marzban L, Rahimian R, Brownsey RW, McNeill JH. Mechanisms by which bis(maltolato)oxovanadium(IV) normalizes phosphoenolpyruvate carboxykinase and glucose-6-phosphatase expression in streptozotocin-diabetic rats in vivo. *Endocrinology* **143**, 4636–4645 (2002).
260. Mohammad S, Taha A, Bamezai RN, Basir SF, Baquer NZ. Lower doses of vanadate in combination with trigonella restore altered carbohydrate metabolism and antioxidant status in alloxan-diabetic rats. *Clinica Chimica Acta* **342**, 105–114 (2004).

261. Dion F, Dumayne C, Henley N, Beauchemin S, Arias EB, Leblond FA, Lesage S, Lefrançois S, Cartee GD, Pichette V. Mechanism of insulin resistance in a rat model of kidney disease and the risk of developing type 2 diabetes. *PLoS ONE* **12**, 1–17 (2017).
262. Brouwers B, Pruniau VP, Cauwelier EJ, Schuit F, Lerut E, Ectors N, Declercq J, Creemers JW. Phlorizin pretreatment reduces acute renal toxicity in a mouse model for diabetic nephropathy. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 27200–27207 (2013).
263. Yonamine CY, Pinheiro-Machado E, Michalani ML, Freitas HS, Okamoto MM, Corrêa-Giannella ML, Machado UF. Resveratrol improves glycemic control in insulin-treated diabetic rats: Participation of the hepatic territory. *Nutrition and Metabolism* **13**, doi: 10.1186/s12986-016-0103-0 (2016).
264. Massot-Cladera M, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa polyphenols and fiber modify colonic gene expression in rats. *European Journal of Nutrition* **56**, 1871–1885 (2017).
265. Prince PD, Lanzi CR, Fraga CG, Galleano M. Dietary (-)-epicatechin affects NF-κB activation and NADPH oxidases in the kidney cortex of high-fructose-fed rats. *Food and Function* **10**, 26–32 (2019).
266. Brouwers B, Pruniau VP, Cauwelier EJ, Schuit F, Lerut E, Ectors N, Declercq J, Creemers JW. Grape seed procyanidin B2 protects podocytes from high glucose-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis via the AMPK-SIRT1-PGC-1α axis in vitro. *Food and Function* **7**, 805–815 (2016).
267. Costa-Bauza A, Grases F, Calvó P, Rodríguez A, Prieto RM. Effect of consumption of cocoa-derived products on uric acid crystallization in urine of healthy volunteers. *Nutrients* **10**, doi:10.3390/nu10101516 (2018).
268. Sansone R, Ottaviani JI, Rodríguez-Mateos A, Heinen Y, Noske D, Spencer JP, Crozier A, Merx MW, Kelm M, Schroeter H, Heiss C. Methylxanthines enhance the effects of cocoa flavanols on cardiovascular function: Randomized, double-masked controlled studies. *American Journal of Clinical Nutrition* **105**, 352–360 (2017).
269. Giacometti J, Muhvić D, Pavletić A, Dudarić L. Cocoa polyphenols exhibit antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, and anti-necrotic activity in carbon tetrachloride-intoxicated mice. *Journal of Functional Foods* **23**, 177–187 (2016).
270. Mohan T, Velusamy P, Chakrapani LN, Srinivasan AK, Singh A, Johnson T, Periandavan K. Impact of EGCG Supplementation on the Progression of Diabetic Nephropathy in Rats: An Insight into Fibrosis and Apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **65**, 8028–8036 (2017).
271. Rochette L, Zeller M, Cottin Y, Vergely C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* **1840**, 2709–2729 (2014).

Bibliografía

272. Turkmen K. Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the Four Horsemen of the Apocalypse. *International Urology and Nephrology* **49**, 837–844 (2017).
273. Xie R, Zhang H, Wang XZ, Yang XZ, Wu SN, Wang HG, Shen P, Ma TH. The protective effect of betulinic acid (BA) diabetic nephropathy on streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Food and Function* **8**, 299–306 (2017).
274. Bao L, Cai X, Dai X, Ding Y, Jiang Y, Li Y, Zhang Z, Li Y. Grape seed proanthocyanidin extracts ameliorate podocyte injury by activating peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α in low-dose streptozotocin-and high-carbohydrate/high-fat diet-induced diabetic rats. *Food and Function* **5**, 1872–1880 (2014).
275. Wei J, Wu H, Zhang H, Li F, Chen S, Hou B, Shi Y, Zhao L, Duan H. Anthocyanins inhibit high glucose-induced renal tubular cell apoptosis caused by oxidative stress in db/db mice. *International Journal of Molecular Medicine* **41**, 1608–1618 (2018).
276. Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **300**, 1009–1022 (2011).
277. Habib SL, Yadav A, Kidane D, Weiss RH, Liang S. Novel protective mechanism of reducing renal cell damage in diabetes: Activation AMPK by AICAR increased NRF2/OGG1 proteins and reduced oxidative DNA damage. *Cell Cycle* **15**, 3048–3059 (2016).
278. Ding Y, Choi ME. Autophagy in Diabetic Nephropathy Yan. *The Journal of Endocrinology* **224**, 15–30 (2015).
279. Kitada M, Takeda A, Nagai T, Ito H, Kanasaki K, Koya D. Dietary restriction ameliorates diabetic nephropathy through anti-inflammatory effects and regulation of the autophagy via restoration of sirt1 in diabetic wistar fatty (fa/fa) rats: A model of type 2 diabetes. *Experimental Diabetes Research* **2011**, doi:10.1155/2011/908185 (2011).
280. Yamahara K, Kume S, Koya D, Tanaka Y, Morita Y, Chin-Kanasaki M, Araki H, Isshiki K, Araki S, Haneda M, Matsusaka T, Kashiwagi A, Maegawa H, Uzu T. Obesity-mediated autophagy insufficiency exacerbates proteinuria-induced tubulointerstitial lesions. *Journal of the American Society of Nephrology* **24**, 1769–1781 (2013).
281. Ma L, Fu R, Duan Z, Lu J, Gao J, Tian L, Lv Z, Chen Z, Han J, Jia L, Wang L. Sirt1 is essential for resveratrol enhancement of hypoxia-induced autophagy in the type 2 diabetic nephropathy rat. *Pathology Research and Practice* **212**, 310–318 (2016).

282. Xu XH, Ding DF, Yong HJ, Dong CL, You N, Ye XL, Pan ML, Ma JH, You Q, Lu YB. Resveratrol transcriptionally regulates miRNA-18a-5p expression ameliorating diabetic nephropathy via increasing autophagy. *European review for medical and pharmacological sciences* **21**, 4952–4965 (2017).
283. Toblli JE, Cao G, Giani JF, Angerosa M, Dominici FP, Gonzalez-Cadavid NF. Antifibrotic effects of pioglitazone at low doses on the diabetic rat kidney are associated with the improvement of markers of cell turnover, tubular and endothelial integrity, and angiogenesis. *Kidney and Blood Pressure Research* **34**, 20–33 (2011).
284. Lin CF, Kuo YT, Chen TY, Chien CT. Quercetin-rich guava (*Psidium guajava*) juice in combination with trehalose reduces autophagy, apoptosis and pyroptosis formation in the kidney and pancreas of type II diabetic rats. *Molecules* **21**, doi:10.3390/molecules21030334 (2016).
285. Urpi-Sarda M, Monagas M, Khan N, Llorach R, Lamuela-Raventós RM, Jáuregui O, Estruch R, Izquierdo-Pulido M, Andrés-Lacueva C. Targeted metabolic profiling of phenolics in urine and plasma after regular consumption of cocoa by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1216**, 7258–7267 (2009).
286. Rodriguez-Mateos A, Feliciano RP, Boeres A, Weber T, Dos Santos CN, Ventura MR, Heiss C. Cranberry (poly)phenol metabolites correlate with improvements in vascular function: A double-blind, randomized, controlled, dose-response, crossover study. *Molecular Nutrition and Food Research* **60**, 2130–2140 (2016).
287. Spigoni V, Mena P, Cito M, Fantuzzi F, Bonadonna RC, Brighenti F, Dei Cas A, Del Rio D. Effects on nitric oxide production of urolithins, gut-derived ellagitannin metabolites, in human aortic endothelial cells. *Molecules* **21**, doi:10.3390/molecules21081009 (2016).
288. di Gesso JL, Kerr JS, Zhang Q, Raheem S, Yalamanchili SK, O'Hagan D, Kay CD, O'Connell MA. Flavonoid metabolites reduce tumor necrosis factor- α secretion to a greater extent than their precursor compounds in human THP-1 monocytes. *Molecular Nutrition and Food Research* **59**, 1143–1154 (2015).
289. Grassi D, Desideri G, Mai F, Martella L, De Feo M, Soddu D, Fellini E, Veneri M, Stamerra CA, Ferri C. Cocoa, Glucose Tolerance, and Insulin Signaling: Cardiometabolic Protection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 9919–9926 (2015).
290. Schmitt CA, Dirsch VM. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry* **21**, 77–91 (2009).
291. Ramirez-Sanchez I, Maya L, Ceballos G, Villarreal F. (-)-Epicatechin activation of endothelial cell endothelial nitric oxide synthase, nitric oxide, and related signaling pathways. *Hypertension* **55**, 1398–1405 (2010).

Bibliografía

292. Ramirez-Sanchez, I., Aguilar, H., Ceballos, G., and Villarreal, F. (-)-Epicatechin-induced calcium independent eNOS activation: Roles of HSP90 and AKT. *Molecular and Cellular Biochemistry* **370**, 141–150 (2012).
293. Najmanová I, Pourová J, Vopršalová M, Pilařová V, Semecký V, Nováková L, Mladěňka P. Flavonoid metabolite 3-(3-hydroxyphenyl)propionic acid formed by human microflora decreases arterial blood pressure in rats. *Molecular Nutrition and Food Research* **60**, 981–991 (2016).
294. Edwards M, Czank C, Woodward GM, Cassidy A, Kay CD. Phenolic metabolites of anthocyanins modulate mechanisms of endothelial function. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **63**, 2423–2431 (2015).
295. Lee CC, Kim JH, Kim JS, Oh YS, Hn SM, Park JHY, Lee KW, Lee CY. 5-(3',4'-dihydroxyphenyl)-γ-valerolactone, a major microbial metabolite of proanthocyanidin, attenuates THP-1 monocyte-endothelial adhesion. *International Journal of Molecular Sciences* **18**, doi:10.3390/ijms18071363 (2017).
296. Zheng Q, Yuan Y, Yi W, Lau WB, Wang Y, Wang X, Sun Y, Lopez BL, Christopher TA, Peterson JM, Wong GW, Yu S, Yi D, Ma XL. C1q/TNF-related proteins, a family of novel adipokines, induce vascular relaxation through the adiponectin receptor-1/AMPK/eNOS/nitric oxide signaling pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **31**, 2616–2623 (2011).
297. Kang Z, Jiang W, Luan H, Zhao F, Zhang S. Cornin induces angiogenesis through PI3K-Akt-eNOS-VEGF signaling pathway. *Food and Chemical Toxicology* **58**, 340–346 (2013).
298. Morrow VA, Fougelle F, Connell JM, Petrie JR, Gould GW, Salt IP. Direct activation of AMP-activated protein kinase stimulates nitric-oxide synthesis in human aortic endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 31629–31639 (2003).
299. Liu D, Homan LL, Dillon JS. Genistein acutely stimulates nitric oxide synthesis in vascular endothelial cells by a cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent mechanism. *Endocrinology* **145**, 5532–5539 (2004).
300. Lorenz M, Wessler S, Follmann E, Michaelis W, Düsterhöft T, Baumann G, Stangl K, Stangl V. A Constituent of Green Tea, Epigallocatechin-3-gallate, Activates Endothelial Nitric Oxide Synthase by a Phosphatidylinositol-3-OH-kinase-, cAMP-dependent Protein Kinase-, and Akt-dependent Pathway and Leads to Endothelial-dependent Vasorelaxation. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 6190–6195 (2004).

301. Rizza S, Muniyappa R, Iantorno M, Kim JA, Chen H, Pullikotil P, Senese N, Tesaro M, Lauro D, Cardillo C, Quon MJ. Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **96**, 782–792 (2011).
302. Shen Y, Croft KD, Hodgson JM, Kyle R, Lee IL, Wang Y, Stocker R, Ward NC. Quercetin and its metabolites improve vessel function by inducing eNOS activity via phosphorylation of AMPK. *Biochemical Pharmacology* **84**, 1036–1044 (2012).
303. Luangaram S, Kukongviriyapan U, Pakdeechote P, Kukongviriyapan V, Pannangpetch P. Protective effects of quercetin against phenylhydrazine-induced vascular dysfunction and oxidative stress in rats. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 448–455 (2007).
304. Mele L, Carobbio S, Brindani N, Curti C, Rodriguez-Cuenca S, Bidault G, Mena P, Zanotti I, Vacca M, Vidal-Puig A, D. R. D. Phenyl- γ -valerolactones, flavan-3-ol colonic metabolites, protect brown adipocytes from oxidative stress without affecting their differentiation or function. *Molecular Nutrition and Food Research* **61**, doi: 10.1002/mnfr.201700074 (2017).
305. Qiu Z, Zhou B, Jin L, Yu H, Liu L, Liu Y, Qin C, Xie S, Zhu F. In vitro antioxidant and antiproliferative effects of ellagic acid and its colonic metabolite, urolithins, on human bladder cancer T24 cells. *Food and Chemical Toxicology* **59**, 428–437 (2013).
306. Martín MÁ, Serrano AB, Ramos S, Pulido MI, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoids up-regulate antioxidant enzyme activity via the ERK1/2 pathway to protect against oxidative stress-induced apoptosis in HepG2 cells. *Journal of Nutritional Biochemistry* **21**, 196–205 (2010).
307. Martín MÁ, Fernández-Millán E, Ramos S, Bravo L, Goya L. Cocoa flavonoid epicatechin protects pancreatic beta cell viability and function against oxidative stress. *Molecular Nutrition and Food Research* **58**, 447–456 (2014).
308. Rodríguez-Ramiro, II, Ramos S, Bravo L, Goya L, Martín MÁ. Procyanidin B2 induces Nrf2 translocation and glutathione S-transferase P1 expression via ERKs and p38-MAPK pathways and protect human colonic cells against oxidative stress. *European Journal of Nutrition* **51**, 881–892 (2012).
309. Qian Y, Babu PVA, Symons JD, J. T. Metabolites of flavonoid compounds preserve indices of endothelial cell nitric oxide bioavailability under glucotoxic conditions. *Nutrition and Diabetes* **7**, doi:10.1038/nutd.2017.34 (2017).

Bibliografía

310. Heiss C, Sansone R, Karimi H, Krabbe M, Schuler D, Rodriguez-Mateos A, Kraemer T, Cortese-Krott MM, Kuhnle GG, Spencer JP, Schroeter H, Merx MW, Kelm M. Impact of cocoa flavanol intake on age-dependent vascular stiffness in healthy men: a randomized, controlled, double-masked trial. *Age* **37**, doi: 10.1007/s11357-015-9794-9 (2015).
311. Cosson E, Valensi P, Laude D, Mesangeau D, Dabire H. Arterial stiffness and the autonomic nervous system during the development of Zucker diabetic fatty rats. *Diabetes and Metabolism* **35**, 364–370 (2009).
312. Said MA, Eppinga RN, Lipsic E, Verweij N, van der Harst P. Relationship of arterial stiffness index and pulse pressure with cardiovascular disease and mortality. *Journal of the American Heart Association* **7**, doi: 10.1161/JAHA.117.007621 (2018).
313. Paredes MD, Romecín P, Atucha NM, O'Valle F, Castillo J, Ortiz MC, García-Estaño J. Moderate effect of flavonoids on vascular and renal function in spontaneously hypertensive rats. *Nutrients* **10**, doi:10.3390/nu10081107 (2018).
314. Kahlberg N, Qin CX, Anthonisz J, Jap E, Ng HH, Jelinic M, Parry LJ, Kemp-Harper BK, Ritchie RH, Leo CH. Adverse vascular remodelling is more sensitive than endothelial dysfunction to hyperglycaemia in diabetic rat mesenteric arteries. *Pharmacological Research* **111**, 325–335 (2016).
315. Van Varik BJ, Rennenberg RJ, Reutelingsperger CP, Kroon AA, de Leeuw PW, Schurgers LJ. Mechanisms of arterial remodeling: Lessons from genetic diseases. *Frontiers in Genetics* **3**, doi: 10.3389/fgene.2012.00290 (2012).
316. Salum E, Butlin M, Kals J, Zilmer M, Eha J, Avolio AP, Arend A, Aunapuu M, Kampus P. Angiotensin II receptor blocker telmisartan attenuates aortic stiffening and remodelling in STZ-diabetic rats. *Diabetology and Metabolic Syndrome* **6**, doi: 10.1186/1758-5996-6-57 (2014).
317. Silva MA, Bruder-Nascimento T, Cau SB, Lopes RA, Mestriner FL, Fais RS, Touyz RM, Tostes RC. Spironolactone treatment attenuates vascular dysfunction in type 2 diabetic mice by decreasing oxidative stress and restoring NO/GC signaling. *Frontiers in Physiology* **6**, doi: 10.3389/fphys.2015.00269 (2015).
318. Desmond J, Hitomi H, Griendling K. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Free Radical Biology and Medicine* **40**, 183–192 (2006).
319. García-Redondo AB, Aguado A, Briones AM, Salaices M. NADPH oxidases and vascular remodeling in cardiovascular diseases. *Pharmacological Research* **114**, 110–120 (2016).
320. Li X, Wu G, Han F, Wang K, Bai X, Jia Y, Li Z, Cai W, Zhang W, Su L, Hu D. SIRT1 activation promotes angiogenesis in diabetic wounds by protecting endothelial cells against oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **661**, 117–124 (2019).

321. Ramirez-Sanchez I, Mansour C, Navarrete-Yañez V, Ayala-Hernandez M, Guevara G, Castillo C, Loredó M, Bustamante M, Ceballos G, Villarreal FJ. (-)-Epicatechin induced reversal of endothelial cell aging and improved vascular function: underlying mechanisms. *Food and Function* **9**, 4802–4813 (2018).
322. Eggler AL, Gay KA, Mesecar AD. Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: Induction of cytoprotective enzymes by Nrf2. *Molecular Nutrition and Food Research* **52**, 84–94 (2008).
323. Miao X, Wang Y, Sun J, Sun W, Tan Y, Cai L, Zheng Y, Su G, Liu Q, Wang Y. Zinc protects against diabetes-induced pathogenic changes in the aorta: Roles of metallothionein and nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. *Cardiovascular Diabetology* **12**, doi: 10.1186/1475-2840-12-54 (2013).
324. Wu H, Kong L, Cheng Y, Zhang Z, Wang Y, Luo M, Tan Y, Chen X, Miao L, Cai L. Metallothionein plays a prominent role in the prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane via up-regulation of Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine* **89**, 431–442 (2015).
325. Gu J, Cheng Y, Wu H, Kong L, Wang S, Xu Z, Zhang Z, Tan Y, Keller BB, Zhou H, Wang Y, Xu Z, Cai L. Metallothionein is downstream of Nrf2 and partially mediates sulforaphane prevention of diabetic cardiomyopathy. *Diabetes* **66**, 529–542 (2017).
326. da Costa RM, Rodrigues D, Pereira CA, Silva JF, Alves JV, Lobato NS, Tostes RC. Nrf2 as a potential mediator of cardiovascular risk in metabolic diseases. *Frontiers in Pharmacology* **10**, doi: 10.3389/fphar.2019.00382 (2019).
327. Li X, Watanabe K, Kimura I. Gut microbiota dysbiosis drives and implies novel therapeutic strategies for diabetes mellitus and related metabolic diseases. *Frontiers in Immunology* **8**, doi: 10.3389/fimmu.2017.01882 (2017).
328. Nie Q, Chen H, Hu J, Fan S, Nie S. Dietary compounds and traditional Chinese medicine ameliorate type 2 diabetes by modulating gut microbiota. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 848–863 (2019).
329. Massot-Cladera M, Abril-Gil M, Torres S, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ. Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *British Journal of Nutrition* **112**, 1944–1954 (2014).
330. Martín-Peláez S, Camps-Bossacoma M, Massot-Cladera M, Rigo-Adrover M, Franch À, Pérez-Cano FJ, C. M. Effect of cocoa's theobromine on intestinal microbiota of rats. *Molecular Nutrition and Food Research* **61**, doi: 10.1002/mnfr.201700238 (2017).

Bibliografía

331. Tzounis X, Rodriguez-Mateos A, Vulevic J, Gibson GR, Kwik-Urbe C, Spencer JP. Prebiotic evaluation of cocoa-derived flavanols in healthy humans by using a randomized, controlled, double-blind, crossover intervention study. *American Journal of Clinical Nutrition* **93**, 62–72 (2011).
332. Massot-Cladera M, Pérez-Berezo T, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **527**, 105–112 (2012).
333. Rabelo Andrade ME, Araújo RS, Vieira de Barros PA, N. S. A., and Abrantes FA, Generoso SV, Antunes Fernandes SO, Cardoso VN. The role of immunomodulators on intestinal barrier homeostasis in experimental models. *Clinical Nutrition* **34**, 1080–1087 (2015).
334. Song P, Zhang R, Wang X, He P, Tan L, Ma X. Dietary grape-seed procyanidins decreased postweaning diarrhea by modulating intestinal permeability and suppressing oxidative stress in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**, 6227–6232 (2011).
335. Goodrich KM, Fundaro G, Griffin LE, Grant A, Hulver MW, Ponder MA, Neilson AP. Chronic administration of dietary grape seed extract increases colonic expression of gut tight junction protein occludin and reduces fecal calprotectin: A secondary analysis of healthy Wistar Furth rats. *Nutrition Research* **32**, 787–794 (2012).
336. Gu JF, Su SL, Guo JM, Zhu Y, Zhao M, Duan JA. The aerial parts of *Salvia miltiorrhiza* Bge. strengthen intestinal barrier and modulate gut microbiota imbalance in streptozocin-induced diabetic mice. *Journal of Functional Foods* **36**, 362–374 (2017).
337. Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Neyrinck AM. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic. *Diabetes* **57**, 1470–1481 (2008).
338. Pérez-Berezo T, Ramírez-Santana C, Franch A, Ramos-Romero S, Castellote C, Pérez-Cano FJ, Castell M. Effects of a cocoa diet on an intestinal inflammation model in rats. *Experimental Biology and Medicine* **237**, 1181–1188 (2012).
339. Rodríguez-Ramiro I, Ramos S, López-Oliva E, Agis-Torres A, Bravo L, Goya L, Martín MÁ. Cocoa polyphenols prevent inflammation in the colon of azoxymethane-treated rats and in TNF- α -stimulated Caco-2 cells. *British Journal of Nutrition* **110**, 206–215 (2013).
340. Pandurangan AK, Saadatdoust Z, Esa NM, Hamzah H, I. A. Dietary cocoa protects against colitis-associated cancer by activating the Nrf2/Keap1 pathway. *BioFactors* **41**, 1–14 (2015).
341. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JL. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 11070–11075 (2005).

342. Yang C, Deng Q, Xu J, Wang X, Hu C, Tang H, Huang F. Sinapic acid and resveratrol alleviate oxidative stress with modulation of gut microbiota in high-fat diet-fed rats. *Food Research International* **116**, 1202–1211 (2019).
343. Sze MA, Schloss PD. Looking for a Signal in the Noise: Revisiting Obesity and the Microbiome. *mBio* **7**, doi: 10.1128/mBio.01018-16 (2016).
344. Shin NR, Whon TW, Bae JW. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota. *Trends in Biotechnology* **33**, 496–503 (2015).
345. Allen-Vercoe E, Jobin C. Fusobacterium and enterobacteriaceae: Important players for CRC? *Immunology Letters* **162**, 54–61 (2014).
346. Lo Presti A, Zorzi F, Del Chierico F, Altomare A, Cocca S, Avola A, De Biasio F, Russo A, Cella E, Reddel S, Calabrese E, Biancone L, Monteleone G, Cicala M, Angeletti S, Ciccozzi M, Putignani L, Guarino MPL. Fecal and Mucosal Microbiota Profiling in Irritable Bowel Syndrome and Inflammatory Bowel Disease. *Frontiers in Microbiology* **10**, doi: 10.3389/fmicb.2019.01655 Edited (2019).
347. Zeng H, Liu J, Jackson MI, Zhao FQ, Yan L, Combs GF Jr. Fatty Liver Accompanies an Increase in Lactobacillus Species in the Hind Gut of C57BL/6 Mice Fed a High-Fat Diet. *The Journal of Nutrition* **143**, 627–631 (2013).
348. Ge Y, Liu W, Tao H, Zhang Y, Liu L, Liu Z, Qiu B, Xu T. Effect of industrial trans-fatty acids-enriched diet on gut microbiota of C57BL/6 mice. *European Journal of Nutrition* **58**, 2625–2638 (2018).
349. Del Chierico F, Nobili V, Vernocchi P, Russo A, De Stefanis C, Gnani D, Furlanello C, Zandonà A, Paci P, Capuani G, Dallapiccola B, Miccheli A, Alisi A, Putignani L. Gut microbiota profiling of pediatric nonalcoholic fatty liver disease and obese patients unveiled by an integrated meta-omics-based approach. *Hepatology* **65**, 451–464 (2017).
350. Liu G, Bei J, Liang L, Yu G, Li L, L. Q. Stachyose Improves Inflammation through Modulating Gut Microbiota of High-Fat Diet/Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats. *Molecular Nutrition and Food Research* **62**, doi: 10.1002/mnfr.201700954 (2018).
351. Zhao L, Zhang Q, Ma W, Tian F, Shen H, Z. M. A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota. *Food and Function* **8**, 4644–4656 (2017).
352. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, Almeida M, Arumugam M, Batto JM, Kennedy S, Leonard P, Li J, Burgdorf K, Grarup N, Jørgensen T, Brandslund I, Nielsen HB, Juncker AS, Bertalan M, Levenez F, Pons N, Rasmussen S, Sunagawa. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* **500**, 541–546 (2013).

Bibliografía

353. Anhê FF, Pilon G, Roy D, Desjardins Y, Levy E, Marette A. Triggering Akkermansia with dietary polyphenols: A new weapon to combat the metabolic syndrome? *Gut microbes* **7**, 146–153 (2016).
354. Sung MM, Kim TT, Denou E, Soltys CM, Hamza SM, Byrne NJ, Masson G, Park H, Wishart DS, Madsen KL, Schertzer JD, Dyck JR. Improved glucose homeostasis in obese mice treated with resveratrol is associated with alterations in the gut microbiome. *Diabetes* **66**, 418–425 (2017).
355. Van Hul M, Geurts L, Plovier H, Druart C, Everard A, Ståhlman M, Rhimi M, Chira K, Teissedre PL, Delzenne NM, Maguin E, Guilbot A, Brochot A, Gérard P, Bäckhed F, Cani PD. Reduced obesity, diabetes, and steatosis upon cinnamon and grape pomace are associated with changes in gut microbiota and markers of gut barrier. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* **314**, 334–352 (2018).
356. Rondanelli M. Review on microbiota and effectiveness of probiotics use in older. *World Journal of Clinical Cases* **3**, 156 (2015).
357. Nishitsuji K, Xiao J, Nagatomo R, Umemoto H, Morimoto Y, Akatsu H, Inoue K, Tsuneyama K. Analysis of the gut microbiome and plasma short-chain fatty acid profiles in a spontaneous mouse model of metabolic syndrome. *Scientific Reports* **7**, doi: 10.1038/s41598-017-16189-5 (2017).
358. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes* **7**, 189–200 (2016).
359. Maurer LH, Cazarin CBB, Quatrin A, Minuzzi NM, Costa EL, Morari J, Velloso LA, Leal RF, Rodrigues E, Bochi VC, Júnior MRM, Emanuelli T. Grape peel powder promotes intestinal barrier homeostasis in acute TNBS-colitis: A major role for dietary fiber and fiber-bound polyphenols. *Food Research International* **123**, 425–439 (2019).
360. Wu Y, Dong Y, Atefi M, Liu Y, Elshimali Y, Vadgama JV. Lactate, a Neglected Factor for Diabetes and Cancer Interaction. *Mediators of Inflammation* **2016**, doi: 10.1155/2016/6456018 (2016).
361. Fornoni A, Ijaz A, Tejada T, Lenz O. Role of Inflammation in Diabetic Nephropathy. *Current Diabetes Reviews* **4**, 10–17 (2008).
362. Goya L, Martín MÁ, Sarriá B, Ramos S, Mateos R, Bravo L. Effect of cocoa and its flavonoids on biomarkers of inflammation: Studies of cell culture, animals and humans. *Nutrients* **8**, doi: 10.3390/nu8040212 (2016).
363. Granado-Serrano AB, Martín MÁ, Bravo L, Goya L, Ramos S. Quercetin attenuates TNF-induced inflammation in hepatic cells by inhibiting the NF- κ B pathway. *Nutrition and Cancer* **64**, 588–598 (2012).

364. Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Oudemans-van Straaten H, Ronco C, Kellum JA. Continuous renal replacement therapy: A worldwide practice survey: The Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (B.E.S.T. Kidney) Investigators. *Intensive Care Medicine* **33**, 1563–1570 (2007).
365. Lee IT, Shih RH, Lin CC, Chen JT, Yang CM. Role of TLR4/NADPH oxidase/ROS-activated p38 MAPK in VCAM-1 expression induced by lipopolysaccharide in human renal mesangial cells. *Cell Communication and Signaling* **10**, doi: 10.1186/1478-811X-10-33 (2012).
366. Geerlings SE, Brouwer EC, Van Kessel KC, Gaastra W, Stolk RP, Hoepelman AI. Cytokine secretion is impaired in women with diabetes mellitus. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **30**, 995–1001 (2000).
367. Shi YC, Liao JW, Pan TM. Antihypertriglyceridemia and anti-inflammatory activities of *Monascus* -fermented *dioscorea* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental Diabetes Research* **2011**, doi: 10.1155/2011/710635 (2011).
368. Chao CY, Mong MC, Chan KC, Yin MC. Anti-glycative and anti-inflammatory effects of caffeic acid and ellagic acid in kidney of diabetic mice. *Molecular Nutrition and Food Research* **54**, 388–395 (2010).
369. Rivero A, Mora C, Muros M, García J, Herrera H, Navarro-González JF. Pathogenic perspectives for the role of inflammation in diabetic nephropathy. *Clinical Science* **116**, 479–492 (2009).
370. Lewis A, Steadman R, Manley P, Craig K, de la Motte C, Hascall V, Phillips AO. Diabetic nephropathy, inflammation, hyaluronan and interstitial fibrosis. *Histology and Histopathology* **23**, 731–739 (2008).
371. Xu Q, Prabhu A, Xu S, Manigrasso MB, Maric C. Dose-dependent effects of dihydrotestosterone in the streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **297**, 307–315 (2009).
372. Zeng X, Li F, Quan L, Yao H, Z. J. Effects of 1, 25-dihydroxyvitamin D3 on expression of TGF- β 1, CD68 and MCP-1 in type 2 diabetic nephropathy rat. *Biomedical Research (India)* **28**, 4797–4802 (2017).
373. Li Y, Liu J, Liao G, Zhang J, Chen Y, Li L, Li L, Liu F, Chen B, Guo G, Wang C, Yang L, Cheng J, Lu Y. Early intervention with mesenchymal stem cells prevents nephropathy in diabetic rats by ameliorating the inflammatory microenvironment. *International Journal of Molecular Medicine* **41**, 2629–2639 (2018).
374. Morales-Cano D, Callejo M, Barreira B, Mondejar-Parreño G, Esquivel-Ruiz S, Ramos S, Martín MÁ, Cogolludo A, Moreno L, Perez-Vizcaino F. Elevated pulmonary arterial pressure in Zucker diabetic fatty rats. *PLoS ONE* **14**, doi: 10.1371/journal.pone.0211281 (2019).

Bibliografía

375. Jain M. Histopathological changes in diabetic kidney disease. *Clinical Queries: Nephrology* **1**, 127–133 (2012).
376. Baran D, Vendeville B, Ogborn M, Katz N, Luu T, Rubin E, Nguyen V. Cell adhesion molecule expression in murine lupus-like nephritis induced by lipopolysaccharide. *Nephron* **84**, 167–176 (2000).
377. Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology* **17**, 368–377 (2006).
378. Yokoyama H, Takaeda M, Wada T, Ohta S, Hisada Y, Segawa C, Furuichi K, Kobayashi K. Glomerular ICAM-1 expression related to circulating TNF- α in human glomerulonephritis. *Nephron* **76**, 425–433 (1997).
379. Coimbra TM, Janssen U, Gröne HJ, Ostendorf T, Kunter U, Schmidt H, Brabant G, Floege J. Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes. *Kidney International* **57**, 167–182 (2000).
380. Okada S, Shikata K, Matsuda M, Ogawa D, Usui H, Kido Y, Nagase R, Wada J, Shikata Y, Makino H. Intercellular Adhesion Molecule-1 – Deficient Mice Are Diabetes. *Diabetes* **52**, 2586–2593 (2003).
381. Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, Mozaffari MS, Liou GI, Abdelsayed R. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice. *Vascular Pharmacology* **55**, 149–156 (2011).
382. Schmidt AM, Crandall J, Hori O, Cao R, Lakatta E. Elevated plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in diabetic patients with microalbuminuria: A marker of vascular dysfunction and progressive vascular disease. *British Journal of Haematology* **92**, 747–750 (1996).
383. Stehouwer CD, Gall MA, Twisk JW, Knudsen E, Emeis JJ, Parving HH. Increased urinary albumin excretion, endothelial dysfunction, and chronic low-grade inflammation in type 2 diabetes: progressive, interrelated, and independently associated with risk of death. *Diabetes* **51**, 1157–1165 (2002).
384. Zhou P, Yu JF, Zhao CG, Sui FX, Teng X, Wu YB. Therapeutic potential of EGCG on acute renal damage in a rat model of obstructive nephropathy. *Molecular Medicine Reports* **7**, 1096–1102 (2013).
385. Sun W, Liu X, Zhang H, Song Y, Li T, Liu X, Liu Y, Guo L, Wang F, Yang T, Guo W, Wu J, Jin H, Wu H. Epigallocatechin gallate upregulates NRF2 to prevent diabetic nephropathy via disabling KEAP1. *Free Radical Biology and Medicine* **108**, 840–857 (2017).
386. Luo SF, Chang CC, Lee IT, Lee CW, Lin WN, Lin CC, Yang CM. Activation of ROS/NF- κ B and Ca²⁺/CaM kinase II are necessary for VCAM-1 induction in IL-1 β -treated human tracheal smooth muscle cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **237**, 8–21 (2009).

387. Lv W, Booz GW, Wang Y, Fan F, Roman RJ. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets. *European Journal of Pharmacology* **820**, 65–76 (2018).
388. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochemical Pharmacology* **72**, 1493–1505 (2006).
389. Prince PD, Lanzi CR, Toblli JE, Elesgaray R, Oteiza PI, Fraga CG, Galleano M. Dietary (-)-epicatechin mitigates oxidative stress, NO metabolism alterations, and inflammation in renal cortex from fructose-fed rats. *Free Radical Biology and Medicine* **90**, 35–46 (2016).
390. La Sala L, Prattichizzo F, Ceriello A. The link between diabetes and atherosclerosis. *European Journal of Preventive Cardiology* **26**, 15–24 (2019).
391. Maleki SJ, Crespo JF, Cabanillas B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry* **299**, doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125124 (2019).
392. Brånén L, Hovgaard L, Nitulescu M, Bengtsson E, Nilsson J, Jovinge S. Inhibition of tumor necrosis factor- α reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **24**, 2137–2142 (2004).
393. Lin Y, Bai L, Chen W, Xu S. The NF- κ B activation pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **14**, 45–55 (2010).
394. Erlejtman AG, Jaggers G, Fraga CG, Oteiza PI. TNF α -induced NF- κ B activation and cell oxidant production are modulated by hexameric procyanidins in Caco-2 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**, 186–195 (2008).
395. Bitzer ZT, Glisan SL, Dorenkott MR, Goodrich KM, Ye L, O’Keefe SF, Lambert JD, Neilson AP. Cocoa procyanidins with different degrees of polymerization possess distinct activities in models of colonic inflammation. *Journal of Nutritional Biochemistry* **26**, 827–831 (2015).
396. Bettaieb A, Cremonini E, Kang H, Kang J, Haj FG, Oteiza PI. Anti-inflammatory actions of (-)-epicatechin in the adipose tissue of obese mice. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **81**, 383–392 (2016).
397. Schmidt A, Goepfert C, Feitsma K, Buddecke E. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF- α activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* **164**, 57–64 (2002).

Bibliografía

398. Ludwig A, Lorenz M, Grimbo N, Steinle F, Meiners S, Bartsch C, Stangl K, Baumann G, Stangl V. The tea flavonoid epigallocatechin-3-gallate reduces cytokine-induced VCAM-1 expression and monocyte adhesion to endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **316**, 659–665 (2004).
399. Ramji DP, Davies TS. Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine and Growth Factor Reviews* **26**, 673–685 (2015).
400. Zempo H, Suzuki J, Watanabe R, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M. Cacao polyphenols ameliorate autoimmune myocarditis in mice. *Hypertension Research* **39**, 203–209 (2016).
401. Esser D, Mars M, Oosterink E, Stalmach A, Müller M, Afman LA. Dark chocolate consumption improves leukocyte adhesion factors and vascular function in overweight men. *FASEB Journal* **28**, 1464–1473 (2014).

